

Aus der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am Universitätsklinikum  
Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg



***Prävalenz der Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ I (MEN I) bei  
jungen Patienten mit offenbar sporadischem primären  
Hyperparathyreoidismus oder sporadischen pankreatikoduodenalen  
endokrinen Tumoren***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Alexander Hall**

aus Nordhorn

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am 18.10.2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. Peter Langer

Korreferent: Prof. Dr. Peter H. Kann

*Meinen Eltern*

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>4-15</b>
1.1. Inzidenz, klinische Diagnose und chirurgische Therapie bei sporadischem primären Hyperparathyreoidismus	4
1.2. Inzidenz, klinische Diagnose und chirurgische Therapie bei sporadischen pankreatikoduodenalen endokrinen Tumoren	5
<b>1.3. Die Multiple Endokrine Neoplasie Typ I ( MEN I )</b>	<b>8-15</b>
1.3.1. Häufigkeit und klinisches Erscheinungsbild der MEN I	8
1.3.2. Operatives Vorgehen bei MEN I	10
1.3.3. Vererbungsmodus und molekulare Pathogenese des MEN I-Syndroms	12
<b>1.4. Ziel der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>2. Patienten und Methoden</b>	<b>17-43</b>
2.1. Auswahl der Patienten	17
2.2. Extraktion von genomischer DNA aus Patientenblut	19
2.2.1. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	20

	Seite
2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.3.1. Grundprinzip der Methode	21
2.3.2. Optimierung der Primerbedingungen	25
2.4. Gelelektrophorese	32
2.4.1. Herstellung eines Polyacrylamidgels	33
2.4.2. Herstellung eines Agarosegels	33
2.4.3. Herstellung eines SSCP-Gels	35
2.5. SSCP-Analyse(single strand conformation polymorphism)	36
2.5.1. Grundprinzip der Methode	36
2.5.2. Protokoll der SSCP-Analyse	37
2.5.3. Gewinnung von DNA aus SSCP-Gelen	39
2.5.4. Reamplifizierung der DNA	39
2.5.5. Aufreinigung der DNA	40
2.6. DNA-Sequenzierung	41
2.6.1. Grundprinzip der Methode	41
2.6.2. Protokoll	42
2.7. Statistische Analyse	43
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>44-49</b>
3.1. Häufigkeit, Therapie und klinischer Verlauf von scheinbar sporadischem pHPT oder PET	44
3.2. Daten der MEN I-Gen-Mutationsanalyse	45

	Seite
<b>4. Diskussion</b>	<b>50-60</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>62-78</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>79</b>
7.1. Chemikalien und Geräte	79
7.2. Einwilligungserklärung für molekulargenetische Untersuchungen	82
7.3. Verzeichnis der akademischen Lehrer	83
7.4. Danksagung	84

# **1. Einleitung**

## **1.1. Inzidenz, klinische Diagnose und chirurgische Therapie bei sporadischem primären Hyperparathyreoidismus ( pHPT )**

Der pHPT stellt eine der am häufigsten vorkommenden endokrinen Erkrankungen dar, die mit einer geschätzten jährlichen Inzidenz von 100 - 300 / 100 000 bevorzugt bei Frauen gegenüber Männern im Verhältnis 4 : 1 auftritt (Adami et al., 2002; Stewler et al., 1995). In der überwiegenden Zahl der Fälle ( > 80 %) liegt ein sporadischer pHPT vor, der durch die autonome Hypersekretion eines Adenoms einer einzelnen Nebenschilddrüse verursacht wird und zu einer Erhöhung des Serumkalziums ( > 2,6 mmol / l) bei gleichzeitig inadäquat hohem intakten Parathormon (PTH) im Serum ( > 45 pg / ml bei einem Normbereich von 15-65 pg / ml ) führt.

Bei ungefähr 25 % der asymptomatischen Patienten, die sich keiner Parathyreoidektomie unterziehen, ist mit Langzeitfolgen der Hyperkalzämie zu rechnen, wie Nephrolithiasis, Osteopenie, Knochenschmerzen und Herz-Kreislauf-Schäden (Silverberg et al., 1999).

Einerseits ist die Resektion eines einzelnen Adenoms mit einer ähnlichen Überlebenszeit verbunden, wie man sie in einer gesunden Bevölkerung findet (Nilsson et al., 2002). Andererseits können auch Patienten mit einem milden pHPT auf längere Sicht kardiovaskuläre Komplikationen entwickeln. Deshalb ist die frühe Diagnose und Behandlung von sporadischem pHPT für die Prognose der Patienten wichtig.

In den letzten Jahren wurden deutliche Fortschritte in der klinischen Diagnostik und chirurgischen Therapie des sporadischen pHPT erzielt (Irwin et al., 2004). Zum Beispiel kann man heute eine sichere Diagnose bei Patienten mit Hyperkalzämie durch einen sensitiven und spezifischen Test des intakten PTH stellen.

Die Messung des intakten PTH ermöglicht eine Aussage zur sekretorischen Aktivität der Nebenschilddrüse. Anhand des raschen Abfalls der PTH-Konzentration kann mittels

der PTH-Messung die Vollständigkeit einer Adenomresektion auch intraoperativ beurteilt werden. Erhöhte Konzentrationen des intakten PTH sichern bei einer Hyperkalzämie die Diagnose eines pHPT und ermöglichen somit eine Unterscheidung der beiden Hyperkalzämieformen, pHPT und Tumorhyperkalzämie.

Zur Lokalisation erkrankter Drüsen steht mittlerweile der Ultraschall ( US ) mit einer Sensitivität von 50- 58 % (Weiss et al., 2002; Timm et al., 2003) und die Sestamibi-Szintigraphie mit einer Sensitivität von 72-86 % (Weiss et al., 2002; Timm et al., 2003) zur Verfügung.

Ziel der chirurgischen Therapie ist die Beseitigung der Hyperkalzämie durch Resektion der erkrankten Drüsen. Der bisherige Goldstandard der bilateralen Halsexploration mit Darstellung aller Drüsen wird zunehmend von minimal-invasiven Verfahren abgelöst, bei denen nach vorheriger Lokalisation durch Ultraschall und Sestamibi-Szintigraphie nur die erkrankte Drüse dargestellt und entfernt wird. Bei diesem neuen Operationsverfahren hängt eine vollständige Entfernung des hypersekretorischen Nebenschilddrüsengewebes von der intraoperativen Überwachung der Konzentration des intakten PTH ab. Sowohl bilaterale Exploration wie auch die minimal-invasiven Verfahren zeigen ähnliche Erfolgsraten, d.h. vergleichbare Raten des rekurrenten pHPT (3 % gegenüber 4 %) (Caneiro et al., 2004; Irwin et al., 2004). Vorteile der limitierten Parathyreoidektomie sind eine geringeres Trauma, kurze OP-Zeiten und potentiell ambulante Maßnahmen.

## **1.2. Inzidenz, klinische Diagnostik und chirurgische Therapie bei sporadischen pankreatikoduodenalen endokrinen Tumoren**

Pankreatikoduodenale endokrine Tumore (PET) treten seltener als pHPT mit einer geschätzten Inzidenz von 0,4 – 1 / 100 000 auf (Gumbs et al., 2002; Klöppel et al., 1998). Sie stellen eine heterogene Gruppe von Tumoren des Pankreas und Duodenums dar, die sich in Bezug auf die Histologie, Hormonproduktion sowie biologisches und klinisches Verhalten unterscheiden. Da die meisten PET zur autonomen Überproduktion eines bestimmten Hormons und so zur Manifestation eines klinischen Syndroms führen,



werden sie nach dem von ihnen produzierten Hormon benannt. Entsprechend werden Insulinome (ca. 60-70% aller PET), Gastrinome (ca. 20-30%), sehr seltene VIPome (ca. 3%) und Glucagonome (ca. 1%) unterschieden (Tabelle 1). Daneben gibt es nicht-funktionelle PET (NF-PET) (ca. 20-40% aller PET), die von Inselzellen abstammen, jedoch wegen fehlender Hormonsekretion als funktionell „stumm“ bezeichnet werden.

**Tabelle 1: Pankreatikoduodenale endokrine Tumoren (PET)**

<b>Tumor</b>	<b>Hormon</b>	<b>Syndrom</b>	<b>Anteil an PET</b>
Insulinome	Insulin	Hyperinsulinismus	ca. 60-70%
Gastrinome	Gastrin	Zollinger-Ellison-Syndrom	ca. 20-30%
VIPome	VIP	Vermer-Morrison-Syndrom	ca. 3%
Glucagonome	Glucagon	GlucagonomSyndrom	ca. 1%
nicht-funktionelle Tumore (NF-PET)	-	-	ca. 20-30%

VIP = vaso-intestinales pankreatisches Polypeptid

Das Insulinom ist mit ca. 4 Erkrankungen / 1.000.000 Personen pro Jahr der häufigste funktionelle PET (Buchanan et al., 1998). In der Mehrzahl der Fälle treten benigne, solitäre Tumoren auf, die fast ausschließlich im Pankreas lokalisiert sind. Die Leitsymptome des Insulinoms werden durch Hypoglykämie verursacht: Glukosekonzentration < 40 mg/dl, neuro-glucopenische Symptome der Hypoglykämie und Reversibilität der Symptome durch Glukosegabe.

Für die Diagnostik des Insulinoms wird standardmäßig der Fastentest oder Hungerversuch über 72 Stunden verwendet. Entscheidend für die Indikation zur Operation ist der eindeutige biochemische Nachweis eines organischen Hyperinsulinismus.

Benigne Insulinome können fast immer durch eine Enukleation oder eine parenchymsparende Pankreasresektion dauerhaft geheilt werden

(Rothmund et al., 1990). Solitäre Insuliome können sowohl konventionell chirurgisch als auch minimal-invasiv laparoskopisch entfernt werden.

Von allen PET kommen 20-30% Gastrinome vor, welche das Zollinger-Ellison-Syndrom (ZES) verursachen (Zollinger und Ellison, 1955). Führende Symptome beim ZES sind eine exzessive Magensäuresekretion, rezidivierende Ulzera im Magen, Duodenum und proximalen Jejunum in Gegenwart eines nicht-insulin-produzierenden Pankreastumors. Bei den meisten Patienten ist das Serumgastrin um das 3-10fache der Norm erhöht (Creutzfeldt et al., 1975; Jensen und Gardner, 1993) mit einer damit verbundenen Säurehypersekretion im Magen.

Über bildgebende Diagnostik (abdominale Spiral-Computertomographie und die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (SMS) können Primärtumor, Lymphknotenmetastasen und eventuell vorhandene Lebermetastasen sowie Fernmetastasen dargestellt werden (Gibril et al., 1996).

Eine operative Therapie ist gerechtfertigt, wenn keine diffuse Lebermetastasierung vorliegt. Bei sporadischen Gastrinomen muss eine vollständige Resektion vom Primärtumor und Lymphknotenmetastasen angestrebt werden, um so das Entstehen von Lebermetastasen zu verhindern (Fraker et al., 1994), die die wichtigsten prognostischen Faktoren sind. Das konventionelle chirurgische Vorgehen ist als Standard zu empfehlen. Bei inoperablen Patienten sind die Folgen der Hypersekretion von Magensäure (Ulzera, Refluxkrankheit, Durchfälle) mit Hilfe von Protonenpumpen-Inhibitoren (z.B. Omeprazol, Pantaprazol etc.) gut kontrollierbar.

Nicht-funktionelle PET (NF-PET) ohne charakteristisches Hypersekretionssyndrom machen ca. 20-30% aller PET aus. 70% dieser Tumoren sind maligne. Aufgrund des fehlenden hormonellen Syndroms und des langsamen Wachstums wird die Diagnose von NF-PET oft über Jahre verzögert, wenn bereits Lebermetastasen vorliegen (Jensen, 1999). In 10-15% der Fälle werden asymptomatische NF-PET ganz zufällig im Rahmen einer Bauchoperation oder bei bildgebender Diagnostik festgestellt

(Lo et al., 1996). Die häufigsten Symptome sind unspezifische abdominale Beschwerden (Übelkeit, Erbrechen und Durchfälle), Ikterus und Gewichtsverlust.

Zur Diagnostik eines NF-PET steht die Messung des Serumspiegels von Chromogranin A (CgA) mit einer Sensitivität und Spezifität von ca. 70-100% zur Verfügung (Kourvaraki et al., 2005). Dieser Tumormarker ist bei 60-100% der Patienten mit NF-PET erhöht. Außerdem eignen sich verschiedene bildgebende Verfahren, wie die multiphasische Dünnschicht-Spiral-Computertomographie (CT) des Abdomens, der transabdominale Ultraschall (US) und die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (SMS) zur Differentialdiagnose von NF-PET (Noone et al., 2005; Langer et al., 2004; Virgolini et al., 2005).

Nach Ausschluss einer diffusen Fernmetastasierung ist immer eine Operation indiziert mit dem Ziel einer R0-Resektion von Primärtumor und Metastasen in kurativer Absicht. Eine Operation stellt die einzige Heilungschance für die Patienten dar, die dadurch 5 Jahre und teilweise weitaus länger überleben können, auch wenn Metastasen vorliegen. (Solorzano et al., 2001; Dralle et al., 2004). Bei nicht resektablen Lebermetastasen maligner NF-PET kann eine Chemoembolisation (mit Streptozotocin oder Doxorubizin) palliativ wirken und die Überlebenszeit verlängern. Ebenso ist eine Behandlung mit dem Somatostatinanalogon Sandostatin möglich.

### **1.3. Die Multiple Endokrine Neoplasie Typ I (MEN I)**

#### **1.3.1. Häufigkeit und klinisches Erscheinungsbild der MEN I**

Das MEN I-Syndrom (Wermer-Syndrom) ist selten; die Häufigkeit wird mit 0,01-2,5 / 100 000 geschätzt (Schussheim et al., 2001). Frauen und Männer sind von der Erkrankung in gleicher Häufigkeit betroffen. Die Penetranz beträgt bis zum Alter von 50 Jahren über 90% (Carty et al., 1998; Langer et al., 2001). MEN I wird durch das Auftreten multifokaler Adenome der Nebenschilddrüsen (90 %), neuroendokriner

Tumoren des Pankreas und Duodenums (> 50 %) und von Hypophysenadenomen (45 %), meist Prolaktinomen, charakterisiert (Wermer, 1954; Karges et al., 2000; Brandi et al., 2001). Neben diesen typischen Neoplasien können seltener auch bei 30 % der Patienten Nebennierentumoren mit MEN I vergesellschaftet sein (Langer et al., 2002). Etwa 8 % der MEN I-Patienten haben neuroendokrine Tumoren (Karzinoide) der Bronchien, des Thymus oder des Magens; einzelne Patienten erkranken außerdem an multiplen Lipomen oder Ependymomen (Carty et al., 1998; Skogseid et al., 1996; Trump et al., 1996). Die typischen Organmanifestationen von MEN1 können synchron oder metachron auftreten, wobei nicht alle zur Ausprägung kommen müssen. Multilokuläres Auftreten und Heterogenität sind die wichtigsten Unterschiede MEN I-assoziiierter endokriner Tumore im Vergleich zu sporadischen endokrinen Tumoren.

Der pHPT ist die häufigste Organmanifestation von MEN I und stellt in 50 – 100% der Patienten die erste erkennbare klinische Manifestation dar (Langer et al., 2001; Carty et al., 1998; Trump et al., 1996; Vasen et al., 1989; Benson et al., 1987). Jedoch nur 4–10% aller an pHPT erkrankten Patienten können als MEN I- Patienten diagnostiziert werden (Karges et al., 2002; Marx, 2001). Im Gegensatz zum sporadischen pHPT, bei dem in den meisten Fällen ein Adenom einer einzelnen Nebenschilddrüse vorliegt, können bei MEN I meist alle 4 Drüsen von einer Hyperplasie unterschiedlichen Ausmaßes betroffen sein. Aus retrospektiven klinischen und morphologischen Studien geht außerdem hervor, dass der MEN I - pHPT in der Regel früher, d.h. ab dem ca. 20 – 25 Lebensjahr auftritt (Dean et al., 2000; Doherty et al., 1998). Dieses Kriterium für MEN I stimmt mit anderen hereditären Tumorsyndromen überein.

Pankreatikoduodenale endokrine Tumoren treten bei mehr als 60 % der MEN I-Patienten auf (Burgess et al., 1999; Jensen, 1999) und wurden als erste klinische Manifestation des MEN I-Syndroms bei 30 % der Patienten beobachtet (Langer et al., 2001; Carty et al., 1998; Skogseid et al., 1996). Der häufigste funktionelle Tumor ist das Gastrinom mit 60%, gefolgt vom Insulinom mit ca. 20% und seltenen anderen Tumoren mit weniger als 5% der Fälle. Nicht-funktionelle endokrine Pankreastumore (NF-PET) sind nach neueren Daten mit 50-70% die häufigsten PET bei

MEN I (Bartsch et al., 2005; Skogseid et al., 2001; Lairmore et al., 2000). PET, vor allem Gastrinome, haben ein hohes malignes Potential und stellen heute die häufigste Todesursache bei MEN I-Patienten dar (Karges et al., 2002; Dean et al., 2000; Doherty et al., 1998). Im Gegensatz zu sporadischen PET treten mit MEN I-assoziierte PET in der Regel in frühem Alter ab 30 Jahren auf und haben eine höhere Rate postoperativer Rezidive (Jensen, 1999).

Die frühe Diagnose MEN I-assozierter PET beruht auf biochemischen Untersuchungen sowie auf radiologischem oder endosonographischem Nachweis. Zusätzlich sollte eine SMS zum Staging durchgeführt werden. Insbesondere bei jungen Patienten sollte frühzeitig die MEN I-Erkrankung in die Differentialdiagnose einbezogen werden.

### **1.3.2. Operatives Vorgehen beim MEN I-Syndrom**

Das geeignete Operationsverfahren für pHPT im Rahmen des MEN I-Syndroms ist immer noch Gegenstand kontroverser Diskussionen. Ziele der chirurgischen Therapie sind die Beseitigung der Hyperkalzämie und die möglichst langfristige Verhinderung eines Rezidivs, ohne eine permanente Hypokalzämie zu induzieren (Hubbard et al., 2002).

Während nach subtotaler Parathyreoidektomie (oder 3-1/2-Drüsenresektion) mit und ohne zervikale Thymektomie die Rate postoperativer Rezidive und Persistenz der pHPT-Erkrankung relativ hoch ist (16 – 54 %) (Hellman et al., 1998; Rizzoli et al., 1985), kann die in einigen Zentren als Standardverfahren angewandte totale Parathyreoidektomie mit zervikaler Thymektomie mit und ohne Autotransplantation von Nebenschilddrüsengewebe in die Muskulatur des nicht dominanten Unterarms in 10–25 % der Fälle zu einem dauerhaften Hypoparathyreoidismus mit Hypokalzämie führen. Ein permanenter Hypoparathyreoidismus ist für die oft jungen MEN I-Patienten genauso inakzeptabel wie ein milder Hyperparathyreoidismus aufgrund postoperativer Rezidive. Grundsätzlich ist aufgrund der genetisch determinierten Proliferation beim MEN I-pHPT eine höhere Rate an Rezidiven zu erwarten als beim sporadischen pHPT

(siehe 1.1.). Es gibt auch Vermutungen, dass sich eine vom Alter abhängige Verschlechterung der klinischen Parameter (insbesondere beschleunigte Zunahme des Serumspiegels von intaktem Parathormon von MEN I-Patienten über 40 Jahre) auf die Rezidivrate nach Parathyreoidektomie auswirken könnte (Katai et al., 2001).

Heute stimmen die meisten Autoren darin überein, dass trotz asymmetrischer Drüsenvergrößerung und zeitlich unabhängiger Entwicklung verschiedener Nebenschilddrüsenadenome alle genetisch bestätigten MEN I-Patienten mit zunehmendem Alter eine Vier-Nebenschilddrüsenenerkrankung entwickeln. Darauf beruht die allgemein akzeptierte Operationsstrategie, bei der ersten Operation alle Nebenschilddrüsen (normale und erkrankte) radikal zu entfernen und gleichzeitig eine zervikale Thymektomie durchzuführen, um anhaftendes Nebenschilddrüsenengewebe zu erfassen und einem Thymuskarzinoid vorzubeugen (Doherty et al., 2004; Goudet et al., 2001).

Die Therapie bei neuroendokrinen Tumoren des Pankreas und Duodenums (PET), den wichtigsten prognosebestimmenden Organmanifestationen des familiären MEN I-Syndroms, ist aufgrund der Heterogenität der PET sehr differenziert, in den meisten Fällen chirurgisch, manchmal medikamentös.

Es gibt kontroverse Meinungen bezüglich der Operationsindikation und der Verfahrenswahl bei MEN I-assoziierten PET, insbesondere beim ZES. Langer und Mitarbeiter (Langer et al., im Druck) empfehlen bei biochemisch nachgewiesenem ZES nach Ausschluss einer diffusen Lebermetastasierung eine abdominelle Exploration mit der Absicht, Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen zu entfernen, um eine Lebermetastasierung zu verhindern. Wichtigste Operationsziele sind eine potentielle Heilung, Erhalt der exokrinen und endokrinen Pankreasfunktion und eine niedrige Komplikationsrate. Präoperativ wird der Ort der Gastrinquelle mittels selektiver arterieller Sekretin-Injektionsangiographie (SASI) oder Imamura-Angiographie (Imamura et al., 1987) bestimmt. Liegt die Gastrinquelle im Pankreaskopf, wird in den letzten Jahren eine pyloruserhaltende partielle Pankreatiko-Duodenektomie (PPPD) mit regionaler Lymphadenektomie durchgeführt (Bartsch et al., 2005).

Im Falle einer Gastrinquelle im Pankreaskorpus/-schwanz wird eine erweiterte milzerhaltende Pankreaslinksresektion mit Duodenotomie und Exzision von Gastrinomen aus der Duodenalwand, gegebenenfalls die Enukleation von Tumoren aus dem Pankreaskopf und immer eine regionale Lymphadenektomie empfohlen. Dieses Operationsverfahren wurde in den letzten 10 Jahren als Standardoperation häufig angewendet (Thompson et al., 1989). Wegen des multilokulären Auftretens MEN I-assoziiierter PET sind die bidigitale Palpation und der intraoperative Ultraschall bei jedem Pankreaseingriff operativer Standard.

Während Patienten mit MEN I-ZES ohne Lebermetastasen und kleinen Primärtumoren (<2,5cm) auch unter medikamentöser Therapie eine gute Langzeitprognose mit einem 15-Jahresüberleben von 100% haben (Norton et al., 2001), können Insulinome nur operativ behandelt werden. Standardoperation ist die Pankreaslinksresektion mit Enukleation von Tumoren aus dem Pankreaskopf, wenn ein organischer Hyperinsulinismus biochemisch nachgewiesen wird und keine diffuse Lebermetastasierung vorliegt.

Die OP-Indikation für NF-PET wird von vielen Autoren gesehen, wenn ein oder mehrere Tumoren die Größe von 1 cm Durchmesser überschritten haben und keine diffuse Lebermetastasierung vorliegt. Standardoperation ist dieselbe wie beim MEN I-Insulinom.

### **1.3.3. Vererbungsmodus und molekulare Pathogenese des MEN I-Syndroms**

Paul Wermer hat das MEN I-Syndrom (Wermer-Syndrom) 1954 als familiäre Tumorerkrankung beschrieben (Wermer, 1954). Bei der Suche nach dem ursächlichen Gendefekt gelang 1988 die Lokalisation des für das MEN I-Syndrom verantwortlichen Gens auf dem langen Arm von Chromosom 11 in der Region 13 (11q13) (Larsson et al., 1988). Das MEN I-Gen selbst wurde nach der Klonierung erst 1997 von Chandrasekharappa identifiziert (Chandrasekharappa et al., 1997). Das beschriebene MEN I-Gen besteht aus 10 Exons und kodiert das aus 610 Aminosäuren bestehende

Kernprotein Menin, dem eine Tumorsuppressorfunktion zugeschrieben wird. Menin zeigt keine Homologien mit bisher bekannten Proteinen. Die einzigen bekannten Strukturen innerhalb des Moleküls sind zwei sogenannte Kernlokalisationssignale, die eine Einschleusung in den Zellkern bewirken und zwei sogenannte Leukin-Zipper; das sind reißverschlussartig wirkende Aminosäurenstrukturen, die eine Bindung an die DNA ermöglichen. Heute weiß man, dass Menin mit dem Transkriptionsfaktor JunD interagiert, um die Genexpression eines noch nicht identifizierten Zell-Targets zu regulieren (Agarwal et al., 1999). Auf welche Weise der Bindungspartner JunD am Wachstum und an der Tumorentwicklung beteiligt ist, ist weitgehend unbekannt.

Knudson beschreibt die Tumorentstehung nach seiner „two hit“-Hypothese durch sequenzielle Ausschaltung beider Allele eines Tumorsuppressorgens in einer Körperzelle (Knudson, 1971 und 2001). Das eine Allel muss infolge einer Keimbahnmutation bereits in einer fehlerhaften Form vorliegen. Wird nun auch das zweite Allel durch eine somatische Mutation inaktiviert, hat die betroffene Körperzelle kein funktionierendes Allel mehr und transformiert sich zu einer Tumorzelle. Sie ist für das entsprechende Gen nicht mehr heterozygot. Man spricht von einem Verlust der Heterozygotizität (loss of heterozygosity oder LOH). Die meisten pathologischen Mutationen des MEN I-Gens sind mit einem Funktionsverlust des Menins verbunden und sind mit der Tatsache vereinbar, dass MEN I ein Tumorsuppressorgen ist.

Entsprechend dem autosomal-dominanten Erbgang des MEN I-Syndroms erben MEN I-Patienten das krankheitstragende Gen entweder von der Mutter oder dem Vater. Das Risiko dieser sogenannten MEN I-Mutationsträger, das klinische MEN I-Syndrom zu entwickeln, erreicht im Alter von 45 Jahren schon 80 – 95 % (Karges et al., 2002; Komminoth et al., 1998; Thakker, 1998). Erstgradige Verwandte eines MEN I-Mutationsträgers haben dagegen ein Krankheitsrisiko von 50 %.

Eine DNA-Analyse bei MEN I-Familien ermöglicht eine Diagnose von MEN I-Neoplasien in einem frühen Stadium auch bei Abwesenheit klinischer Symptome und dadurch auf längere Sicht durch geeignete regelmäßige



Überwachungsprogramme und operative Strategien eine Verbesserung der Prognose von MEN1-Patienten und eine Reduktion der MEN I-assoziierten Mortalität.

Mit Hilfe eines genetischen Screenings können Keimbahnmutationen in einer Familie mit MEN I-Syndrom bestimmt und die MEN I-Mutationsträger einer Familie identifiziert werden. Heterozygote Keimbahnmutationen des MEN I-Gens wurden bei 80 - 90 % der Patienten mit familiärem MEN I nachgewiesen (Agarwal et al., 1997).

Heute sind mehr als 300 verschiedene MEN I-Keimbahnmutationen in MEN I-Familien auf der ganzen Welt publiziert (Gagel und Marx, 2002). Diese Mutationen sind über die gesamte Gensequenz gleich verteilt (Bartsch et al., 1998; Agarwal et al., 1999; Giraud et al., 1998). MEN I unterscheidet sich durch seine komplexe Genetik fundamental von MEN II, wo im so genannten RET-Protoonkogen nur wenige „hot spots“, d.h. Orte mit häufigen und typischen Mutationen auftreten, die dann auch mit typischen Phänotypen und Krankheitsverläufen verbunden sind. Ganz allgemein können trunkierende Mutationen mit aggressiven Krankheitsverläufen (z.B. häufige Rezidive, Patienten mit relativ jungem Erkrankungsalter <40 Jahren) verbunden sein und auf eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation hinweisen.

Mit der Einführung der molekulargenetischen Diagnostik wurde deutlich, dass das Ausmaß und der Schweregrad der Endokrinopathien und die Zeit der Erkrankungsmanifestation bei MEN I sehr variieren. Es können mehrere Organe gleichzeitig betroffen sein, wie beim klassischen familiären MEN I, oder nur ein einziges Organ, wie beim familiären isolierten pHPT, einer milden Variante des MEN I-Syndroms (Kassem et al., 2000). Es zeigte sich außerdem, dass nur 12 – 53 % der genetisch bestätigten MEN I-Patienten bei der Erstdiagnose eine Beteiligung von zwei oder mehr Organen haben (Langer et al., 2001; Karges et al., 2002). Während beim familiären MEN I-Syndrom mit 2 oder 3 Organmanifestationen der Nachweis von Menin-Mutationen in fast 90 % der Fälle gelingt, können bei Patienten mit sporadischen MEN I-typischen Tumoren (z.B. pHPT oder PET), die eine negative Familiengeschichte aufweisen, in weniger als 30 % der Fälle MEN I-Genmutationen bestätigt werden (Dralle, 2002; Uchino et al., 2000; Heppner et al., 1997; Zhuang et al., 1997). Auf der anderen Seite können nur 4 - 10 % aller Fälle mit pHPT und 10 – 40 % mit PET einer

MEN I-Erkrankung zugeordnet werden (Marx, 2001; Karges et al., 2002; Thakker, 2000).

Wegen dieser großen klinischen Variabilität und komplexen Genetik des MEN I-Syndroms ist die Unterscheidung einer MEN I-Erkrankung von einer sporadisch auftretenden Endokrinopathie (z.B. pHPT und PET) in einem frühen Stadium schwierig. Die Identifizierung einer MEN I-Keimbahnmutation und die Diagnose von MEN I hat jedoch wichtige Konsequenzen für den einzelnen Patienten. Erstens ist die operative Therapie der Endokrinopathien (pHPT und PET) bezüglich Zeitpunkt und Ausmaß des Eingriffs bei Patienten mit sporadischen Tumoren vollkommen anders als bei Patienten mit MEN I (siehe 1.1., 1.2. und 1.3.2.). Zweitens leiten sich aus der Diagnose von MEN I regelmäßige klinische Früherkennungsuntersuchungen (jährliches prospektives Screening: biochemische sowie radiologische oder endosonographische Untersuchungen) ab, um frühzeitig die Entwicklung MEN I-assoziiierter Tumore zu diagnostizieren und eine frühzeitige Therapie zu ermöglichen. Drittens wird für Familienangehörige eine genetische Beratung und MEN I-Mutationsanalyse empfohlen.

#### **1.4. Ziel der Arbeit**

Ziel der Arbeit ist, die Prävalenz festzulegen, mit der MEN I-Keimbahnmutationen bei jungen Patienten (40 Jahre oder jünger) mit offenbar sporadischem pHPT oder sporadischen PET auftreten. Basierend auf den Ergebnissen dieser Untersuchungen soll die Frage beantwortet werden, ob junge Patienten unter 40 Jahren mit nicht familiärem pHPT und PET von einer MEN I-Gen-Mutationsanalyse hinsichtlich des klinischen und operativen Managements profitieren können.

## **2. Patienten und Methoden**

### **2.1. Auswahl der Patienten**

Prospektiv gesammelte klinische Daten von 705 Patienten, die im Zeitraum von April 1987 bis Dezember 2001 wegen eines pHPT, und von 93 Patienten, die aufgrund eines PET in der Chirurgischen Klinik operiert worden sind, sind nach folgenden Kriterien analysiert worden:

- Keine positive Familienanamnese für MEN I,
- 40 Jahre alt oder jünger zum Zeitpunkt der Diagnose,
- Manifestation in nur einem Organ und
- entweder pHPT oder PET.

Die Krankenakten von 18 Patienten mit pHPT und 11 Patienten mit PET, die diese Kriterien erfüllten, wurden hinsichtlich ihrer Krankengeschichte, der durchgeführten Operation, der Histologie und weiterführenden Behandlung ausgewertet. Die Patienten wurden entweder telefonisch über die chirurgische Poliklinik oder durch einen Besuch zu Hause von einem Arzt über diese Studie informiert. Nachdem eine schriftliche Einverständniserklärung vorlag, wurde den Patienten Blut für eine genetische Analyse abgenommen. Fünfzehn Patienten mit pHPT und acht mit PET haben sich einverstanden erklärt, an dieser Studie teilzunehmen. Die weiterführenden Krankendaten, inklusive relevanter Laborbefunde entweder für pHPT oder PET, wurden durch die chirurgische Poliklinik oder durch den Hausarzt beschafft.

**Tab. 1A: Klinische Daten der PET-Patienten**

NPT = nicht- funktioneller endokriner Pankreastumor

<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Art der PET</b>	<b>Alter bei Diagnose</b>	<b>OP-Datum</b>
1	weiblich	Insulinom	32	2001
2	männlich	Insulinom	33	1988
3	männlich	Insulinom	33	2000
4	weiblich	Insulinom	40	2000
5	weiblich	Insulinom	20	1989
6	weiblich	Gastrinom	34	1988
7	weiblich	Gastrinom	29	1998
8	männlich	NPT	27	1999

**Tabelle 1B: Klinische Daten der pHPT-Patienten**

<b>Nummer</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Tumor</b>	<b>Alter bei Diagnose</b>	<b>OP-Datum</b>
1	männlich	pHPT	26	1998
2	männlich	pHPT	22	1988
3	männlich	pHPT	38	2000
4	weiblich	pHPT	35	2000
5	männlich	pHPT	40	2000
6	weiblich	pHPT	22	1996
7	weiblich	pHPT	16	1987
8	weiblich	pHPT	23	1994
9	weiblich	pHPT	23	2001
10	männlich	pHPT	34	1990
11	weiblich	pHPT	29	1996
12	männlich	pHPT	33	1997
13	weiblich	pHPT	28	1997
14	männlich	pHPT	23	2000
15	weiblich	pHPT	25	2001

## **2.2. Extraktion von genomischer DNA aus Patientenblut**

Die hier verwendete Methode zur DNA-Isolation wurde nach Miller et al., (1988) modifiziert. Von dem bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen EDTA-Patientenblut wurden nach dem Auftauen zu Beginn 10 ml Blut entnommen und zusammen mit 30 ml eiskaltem Erythrozyten-Lysepuffer (RCLB) in ein 50 ml Falconröhrchen pipettiert und nach gründlichem Mischen für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nachdem die Erythrozyten lysiert waren, wurden jetzt die Leukozyten durch zehnmütiges Zentrifugieren bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 3000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Dem verbleibenden Leukozytensediment wurden 30 ml RCLB hinzugegeben und durch erneute zehnmütige Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 3000 rpm gewaschen. Auch hier wurde der Überstand wieder verworfen. Zu dem verbleibenden Pellet wurden jetzt 5 ml SE-Puffer, 25  $\mu\text{l}$  Proteinase K (10mg/ml) und 250  $\mu\text{l}$  einer 10 %igen SDS-Lösung hinzugefügt und dieses Gemisch über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad unter permanentem Schütteln inkubiert, bis durch den proteolytischen Abbau eine klare Lösung entstanden war.

Am nächsten Tag wurden zur klaren Lösung nochmals 5 ml SE-Puffer hinzupipettiert und im Wasserbad bei  $55^{\circ}\text{C}$  für 20 Minuten unter permanentem Schütteln inkubiert. 3 ml einer 5 M NaCl-Lösung wurden nach dieser Inkubationszeit hinzugefügt; für einige Sekunden wurde das Gemisch gut geschüttelt und im Anschluss bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Die dadurch ausgefällten Proteine zeigten sich jetzt als Sediment am Boden des Falconröhrchens, der DNA-enthaltende klare Lösungsanteil wurde nun in ein neues 50 ml Falconröhrchen überführt und mit der 1-2fachen Volumenmenge an eiskaltem Ethanol vermischt und so lange stehengelassen (ca. 20-30 Minuten), bis die DNA hierdurch ausgefällt und sichtbar geworden war.

Jetzt konnte die DNA mit einem Glashaken aufgenommen werden. Nach kurzer Spülung mit 70 %igem Ethanol wurde dann die DNA in einer sterilen TE-Pufferlösung im Wasserbad für 1-2 Stunden bei  $50^{\circ}\text{C}$  aufgelöst, um am Ende über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert zu werden.

### **2.2.1. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

Am Tag nach der DNA-Extraktion erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung. Damit für spätere PCR-Experimente (siehe 2.3.) eine möglichst gleiche Konzentration von Patienten-DNA vorliegt, wurde die DNA-Konzentration im gelösten TE-Puffer bei 260 nm Wellenlänge, wo die Basen der DNA ihr Absorptionsmaximum besitzen, photometrisch bestimmt. Ein Teil der Stammlösung wurde hierzu mit destilliertem Wasser auf ein Verhältnis von 1: 200 verdünnt und im Anschluss die Extinktion bei 260 nm im Spektralphotometer gemessen. Die DNA-Konzentration lässt sich nach dem Lambert-Beer-Gesetz nach folgender Formel berechnen:

$$\text{DNA-Konzentration [ } \mu\text{g/ml ]} = \text{Verdünnung} \times 50 \mu\text{g/ml} \times E_{260\text{nm}}$$

Eine Extinktion [E] von 1 entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  DNA. Die DNA-Konzentration sollte sich im Rahmen von 300 – 1000  $\mu\text{g/ml}$  befinden.

Um den Grad der Verunreinigung durch Proteine zu bestimmen, wurde dieselbe Probe bei einer Wellenlänge von 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) photometrisch bestimmt und der Extinktionsquotient  $E_{260} / E_{280}$  berechnet. Der Quotient sollte zwischen 1,5 -2 liegen und entspricht dann einem guten Reinheitsgrad.

### **Verdünnung und Lagerung von DNA**

Als Arbeitslösung für die Polymerasekettenreaktion wurden die DNA-Konzentrationen mit Hilfe von 1x TE-Puffer auf 50 ng /  $\mu\text{l}$  verdünnt und bei - 20° C tiefgefroren eingelagert.

## **2.3. Polymerase-Kettenreaktion ( PCR )**

### **2.3.1. Grundprinzip der Methode**

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, bestimmte DNA-Abschnitte aus einem Genom gezielt zu vervielfältigen.

Entdeckt wurde dieses *in vitro*-Verfahren 1985 von K.B. Mullis aus Kalifornien und ist in den darauffolgenden Jahren von ihm und seinen Mitarbeitern zu der heute gängigen Standardmethode in der Molekularbiologie modifiziert worden (Newton et al., 1994).

Grundvoraussetzung für den Einsatz der PCR ist die Kenntnis der Nukleotidsequenzen des doppelsträngigen DNA-Abschnittes, welcher vervielfältigt werden soll. Dann können sich kurze, einzelsträngige Oligonukleotide, sog. Primer, die komplementär zu dem Abschnitt der DNA-Sequenz sind und amplifiziert werden sollen, als Starterhilfe gegenläufig an die Zielsequenz binden.

Eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) ist jetzt unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Anwesenheit von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dTNPs) in der Lage, am 3'OH-Ende der Primer neue DNA-Stränge zu synthetisieren, deren Sequenz komplementär zur Ausgangssequenz ist.

Das Prinzip der Amplifikation von DNA mittels PCR vollzieht sich also in drei Schritten, die jeweils ca. 30–35 mal wiederholt werden.

- 1) Die doppelsträngige Ausgangs-DNA wird zu Beginn der Reaktion einmalig durch Erhitzen auf 96° C für 3 min denaturiert und in zwei komplementäre Einzelstränge aufgeteilt. Im ersten Zyklusschritt wird bei 96° C für 30 Sekunden die DNA denaturiert und die TAQ- Polymerase aktiviert.



- 2) Im zweiten Zyklusschritt vollzieht sich das sog. Annealing, also das Anheften der Primer an die komplementären Sequenzen der Einzelstrang-DNA. Der hierfür benötigte Temperaturbereich (Annealingtemperatur) ist für jedes Primerpaar unterschiedlich und wurde im Vorfeld experimentell (siehe Kapitel 2.3.2.) ermittelt und liegt bei den hier verwendeten Primern zwischen 58° C und 63° C. Die Dauer des zweiten Zyklusschrittes beträgt ebenfalls 30 Sekunden.
- 3) Im dritten Zyklusschritt vollzieht sich dann die eigentliche DNA-Synthese. Die DNA-Polymerase baut in ihrem optimalen Temperaturbereich von 72° C die dem Reaktionsgemisch zugegebenen Desoxyribonukleosidtriphosphate am 3'OH-Ende der Primer entsprechend der DNA-Matrize ein, und es entsteht eine neue Doppelstrang-DNA. Auch dieser Zyklusschritt dauert 30 Sekunden.

Nach dem ersten Durchlauf aller drei Zyklusschritte ist also aus der einen Ausgangs-DNA ein zweiter, neuer DNA-Strang entstanden, der mit der „Ausgangssequenz“ identisch ist. Dieser neu synthetisierte DNA-Strang dient zusammen mit der Ausgangs-DNA als Vorlage für die zweite Wiederholung der Zyklusschritte. Durch weitere Wiederholungen dieser Zyklen von bis zu 35mal wird die Ausgangs-DNA exponentiell auf das bis zu 10 hoch 7fache vermehrt. Eine schematische Darstellung des Grundprinzips der Methode erläutert Abbildung 1.

Begrenzender Faktor für die Amplifizierung der DNA ist meistens die Enzymmenge der Polymerase oder deren Aktivität, da durch die Hitze das Enzym im Laufe der Reaktion denaturiert. Ferner kommt es durch Zunahme der DNA-Konzentration im Reaktionsgemisch zu einer Anlagerung (Hybridisierung) der DNA-Stränge untereinander, wodurch die Anlagerung der Primer behindert wird. Es ist aus diesem Grund nicht sinnvoll, die Zyklusschritte öfter als 35 mal zu wiederholen.

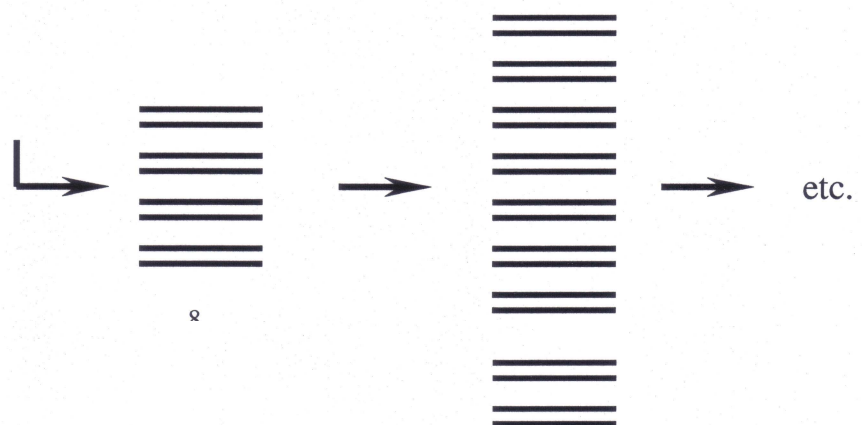
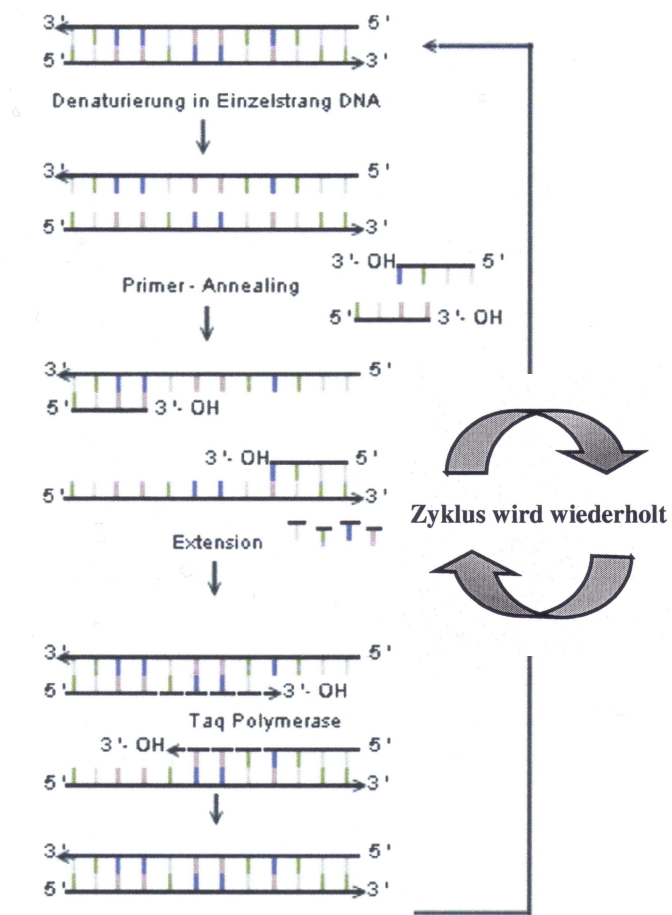
Das zyklische Erhitzen und Abkühlen auf die entsprechenden Temperaturbereiche wird von computergestützten Thermocyclern übernommen, die die Temperaturen aller im Thermocycler enthaltenen Proben in wenigen Sekunden anheben oder absenken können.

Da die in der vorliegenden Arbeit benutzten Thermocycler alle einen beheizbaren Deckel aufwiesen, kann auf die Zugabe von Mineralöl zur Verhinderung einer Verdunstung des Reaktionsgemisches verzichtet werden. Nach Abschluss aller 35 Zyklen werden die amplifizierten Proben automatisch auf 4° C abgekühlt und entweder sofort weiter verwertet oder bei – 20° C tiefgefroren gelagert.

Als Standardansatz eines PCR-Reaktionsgemisches von 10µl gilt folgende Zusammensetzung:

<b>Zusatz</b>	<b>Menge ( µl )</b>	<b>Konzentration der Stammlösung</b>
DNA	1,0	50 ng/µl
Primer forward	0,4	10 pmol/µl
Primer reverse	0,4	10 pmol/µl
TAQ-Polymerase	0,1	5 U/µl
dTNPs	0,8	10mM
Puffer	1,0	10 x
H <sub>2</sub> O	6,3	

Dieses PCR-Reaktionsgemisch wurde zu Beginn der experimentellen Arbeit durch Zugabe weiterer Faktoren wie MgCl<sub>2</sub>, Dimethylsulfoxid (DMSO) oder verschiedener Puffer variiert und damit für jeden Primer spezifisch optimiert (siehe Kapitel 2.3.2.).



**Abb.1: Schematische Darstellung der PCR**

### 2.3.2. Optimierung der Primerbedingungen

Bevor der PCR-Reaktionsansatz mit der zu untersuchenden Patienten-DNA angesetzt wurde, wurden zu Beginn der Arbeit mit Hilfe von Wildtyp-DNA die optimalen Reaktionsbedingungen für jedes einzelne der 14 Primerpaare ermittelt. Variable Größen waren hier die Annealingtemperatur, die  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration, verschiedene Pufferlösungen und die Zugabe von Reaktionsbeschleunigern wie Dimethylsulfoxid (DMSO).

Wie schon in Kapitel 2.3.1. erwähnt, benötigen die Oligonukleotidprimer für die Bindung an die DNA-Matrize eine bestimmte Hybridisierungstemperatur ( $T_m$ ), die sich grundsätzlich im Temperaturbereich von  $37^\circ\text{C}$  bis  $65^\circ\text{C}$  befinden kann und für die Optimierung der Spezifität einer PCR entscheidend ist.

Magnesiumchloridionen bilden im Reaktionsansatz zusammen mit den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dTNPs) einen löslichen Komplex, der für den Einbau von dTNPs entscheidend ist. Weiterhin stimulieren sie die Polymeraseaktivität und erhöhen die Hybridisierungstemperatur ( $T_m$ ) sowohl des DNA-Doppelstranges als auch der Bindung zwischen Matrize und Primer. Die optimale Konzentration der  $\text{MgCl}_2$ -Ionen liegt normalerweise zwischen 1,0–1,5 Millimolar (mM).

Der im Standardansatz einer PCR (siehe Kapitel 2.5.1.) eingesetzte Puffer wird als zehnfach konzentrierter Puffer verwendet und setzt sich aus folgenden Einzellösungen zusammen: 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0,1 % Gelatine bei einem pH-Wert von 8,3. Veränderungen der Konzentration von KCl und  $\text{MgCl}_2$  zueinander ergeben neue Pufferlösungen mit veränderten pH-Werten, die sich ebenfalls positiv auf die PCR-Reaktionsbedingungen auswirken können.

Dimethylsulfoxid (DMSO) findet als Lösungsmittel vielfältigen Einsatz in Labor und Industrie. In der PCR-Reaktion wirkt es als Reaktionsbeschleuniger und kann die Geschwindigkeit bis auf das 10 hoch 9fache steigern.

Als Nachweisverfahren für die Endprodukte der PCR, die Amplikons, wurde zur Primer-Optimierung die Polyacrylamidgelelektrophorese gewählt. Mit ihrer Hilfe war es möglich, die Ausbeute einer PCR quantitativ abzuschätzen, die Amplikons ihrer Größe nach aufzutrennen und durch anschließendes kurzzeitiges Eintauchen des Polyacrylamidgels in ein Wasserbad mit Ethidiumbromid, einem Fluoreszenzfarbstoff, die DNA-Banden durch UV-Bestrahlung sichtbar zu machen. Zur Größenbestimmung des Amplikons wurde jedem Polyacrylamidgel ein Größenmarker hinzugegeben, der von 50 Basenpaaren (bp) bis 1000 bp reichte. Am Ende wurde jedes Gel abfotografiert und das Bild archiviert. Anhand der so dokumentierten Ergebnisse wurden die PCR-Bedingungen entweder für die zu untersuchende Patienten-DNA übernommen oder wie oben gezeigt weiter variiert.

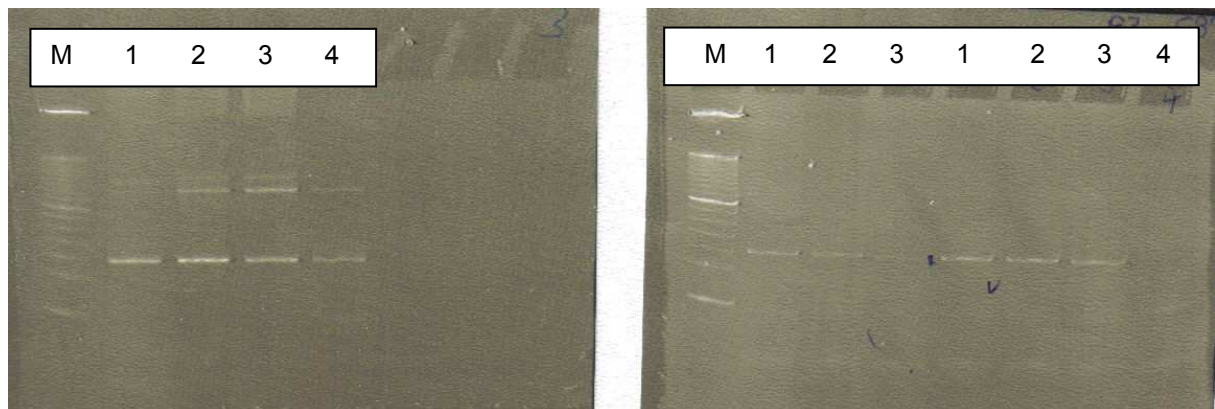
### **PCR-Reaktionsansatz, PCR-Zyklusbedingungen und Ergebnisse der Gelelektrophorese anhand der Optimierung von Primer 3, 6 und 8 :**

**Zu Primer 3 :** Veränderung der Annealingtemperatur von 58° C auf 59° C

<b>Zusatz</b>	<b>Menge (µl)</b>
Primer forward	0,4
Primer reverse	0,4
dTNPs	0,8
10x Puffer	1,0
DNA	1,0
TAQ-Polymerase	0,1
DMSO	0,5
MgCl	0,2 / 0,3/ 0,4
H <sub>2</sub> O	5,6 / 5,5/ 5,4

## PCR-Zyklen

1.	96 °C	96 °C	58 °C	72 °C
	3 min	30 sec	30 sec	30 sec
2.	96 °C	96 °C	59 °C	72 °C
	3 min	30 sec	30 sec	30 sec



**Abb.2: Ergebnisse der Polyacrylamidgelelektrophoresen für Primer 3 bei Veränderung der Annealingtemperatur von 58 °C auf 59 °C**

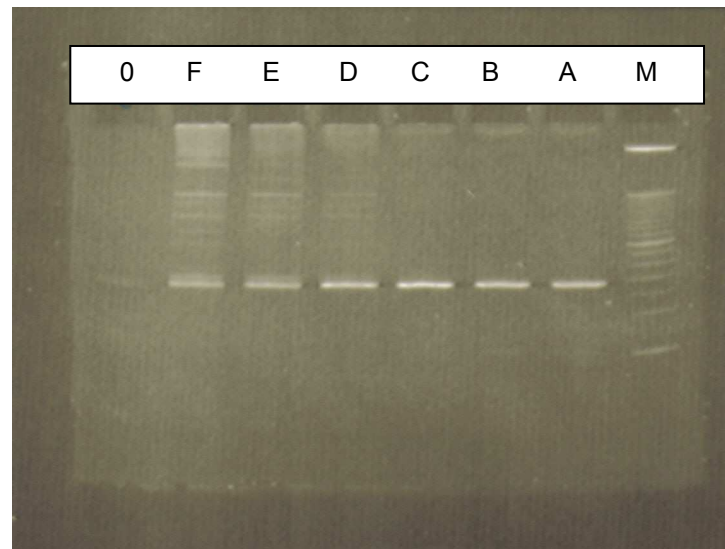
Das linke Bild zeigt die Gelelektrophorese für Primer 3 bei 58 °C. Als Proben werden aufgetragen: bei M Marker-DNA, bei 1-3 Wildtyp-DNA und bei 4 Wasser zur Kontrolle. Das rechte Bild zeigt die Gelelektrophorese für Primer 3 bei 59 °C. Auch hier werden entsprechende Proben wie im linken Bild aufgetragen.

**Zu Primer 6 :** Veränderung der MgCl-Konzentration bei konstanter Annealingtemperatur

Zusatz	Menge (µl)
Primer forward	0,4
Primer reverse	0,4
dTNPs	0.8
10x Puffer	1,0
DNA	1,0
TAQ-Polymerase	
MgCl <sub>2</sub>	0,2 / 0,3 / 0,4 / 0,5 / 0,7 / 1,0
H <sub>2</sub> O	6,1 / 6,0 / 5,9 / 5,8 / 5,7 / 5,4

### PCR-Zyklen

1.	96 °C	96 °C	62 °C	72 °C
	3 min	30 sec	30 sec	30 sec



**Abb.3: Ergebnisse der Polyacrylamidgelelektrophoresen für Primer 6 bei Veränderung der  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration**

Als Proben wurden aufgetragen PCR-Reaktionsansätze mit Wildtyp-DNA, Primer 6 bei 62 °C und verschiedenen  $\text{MgCl}_2$ -Konzentrationen, bei A 1mM, B 1,5 mM, C 2,0 mM, D 2,5 mM, E 3 mM und bei F 5 mM  $\text{MgCl}_2$  sowie bei 0 Wasser als Kontrolle und bei M Marker-DNA.

**Zu Primer 8:** Veränderungen innerhalb der Pufferkonzentrationen

**Tabelle 2: Veränderungen innerhalb der Pufferkonzentrationen**  
(siehe Herstellerangaben)

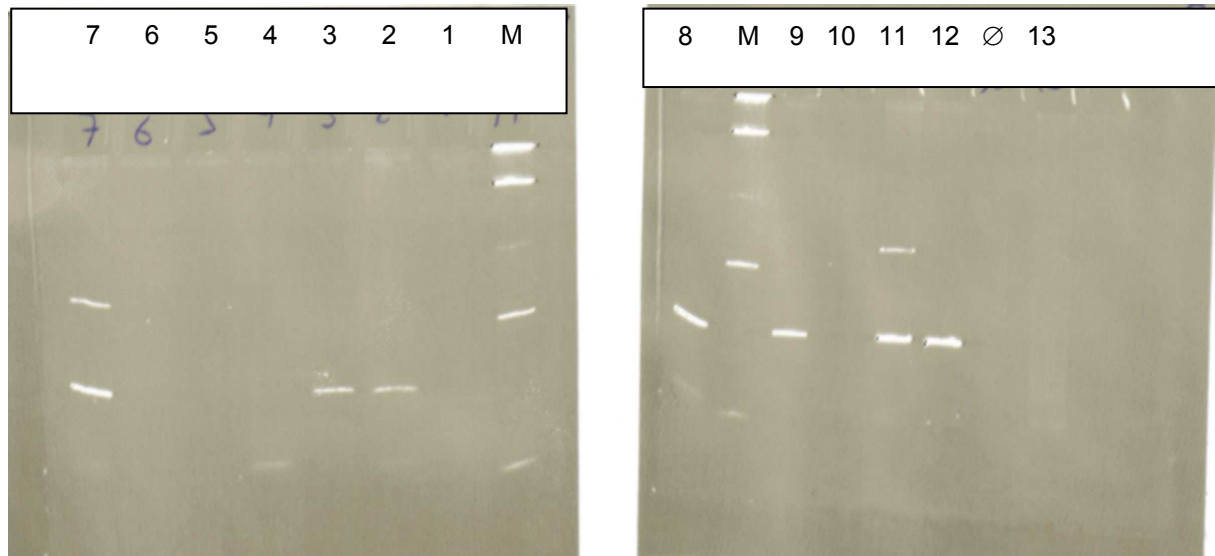
Puffer-Nr.	Tris-HCl (mM)	pH	MgCl <sub>2</sub> (mM)	KCl (mM)
1	100	8,3	15	250
2	100	8,3	15	750
3	100	8,3	35	250
4	100	8,3	35	750
5	100	8,8	15	250
6	100	8,8	15	750
7	100	8,8	35	250
8	100	8,8	35	750
9	100	9,2	15	250
10	100	9,2	15	750
11	100	9,2	35	250
12	100	9,2	35	750

<b>Zusatz</b>	<b>Menge (µl)</b>
Primer forward	0,4
Primer reverse	0,4
dTNPs	0,8
Puffer 1-12	je 1,0
DNA	1,0
TAQ-Polymerase	0,1
H <sub>2</sub> O	6,1
Master puffer	0,2

**PCR-Zyklen**

1.	96 °C	96 °C	62 °C	72 °C
	3 min	30 sec	30 sec	30 sec





**Abb.5:** Ergebnisse der Polyacrylamidgelelektrophoresen mit Primer 8 bei Veränderung der Pufferkonzentrationen. Es wurden verschiedene PCR-Reaktionsansätze mit Wildtyp-DNA, Primer 8 und Puffer Nr. 1-12 (siehe Tabelle 2) sowie Marker DNA und Wasser zur Kontrolle aufgetragen.

**Tabelle 3: PCR-Bedingungen mit neuer DNA Taq Polymerase (PAN Biotech)  
für MEN1-Mutationsanalysen**

Primer- paar	Exon	PCR- Reaktions- puffer	MgCl <sub>2</sub> - Konzentration in mM	Annealing Temperatur in °C	Fragment- länge in bp
2AA	2	10 x NH <sub>4</sub> -P	Puffer 8	62	203
2	2	10 x NH <sub>4</sub> -P	Puffer 2	59	202
2	2	10 x NH <sub>4</sub> -P	1,0	59	152
4	2	10 x NH <sub>4</sub> -P	1,5	59	181
5	3	10 x NH <sub>4</sub> -P	1,25	59	197
6	3	10 x NH <sub>4</sub> -P	1,0	62	190
7	4	10 x NH <sub>4</sub> -P	1,25	61	192
8	5	10 x NH <sub>4</sub> -P	Puffer 12	58	160
9	6	10 x NH <sub>4</sub> -P	1,0	60	170
10	7	10 x NH <sub>4</sub> -P	1,0	60	251
11	8	10 x NH <sub>4</sub> -P	Puffer 8	63	218
12	9	10 x NH <sub>4</sub> -P	1,0	59	246
13	10	10 x NH <sub>4</sub> -P	1,0	63	203
14	10	10 x NH <sub>4</sub> -P	1,0	63	227
15	10	10 x NH <sub>4</sub> -P	1,5	63	253

## 2.4. Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese ist es möglich, die Amplikons als PCR-Endprodukt ihrer Molekülgröße entsprechend aufzutrennen und damit nachzuweisen. Da die Nukleotide als Hauptladungsträger Phosphatgruppen enthalten, die negativ geladen sind, wandern die gelösten DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Das Gel als Trägermatrix wirkt hierbei wie eine Art Molekularsieb, durch welches kleine Moleküle sehr schnell von der Kathode zur Anode wandern, größere Moleküle eher langsamer.

Neben der Molekülgröße hängt die Laufgeschwindigkeit noch von der Gelkonzentration (je höher die Gelkonzentration, desto besser lassen sich kleine DNA-Fragmente nachweisen) sowie von der Höhe der angelegten Spannung (Gleichstrom) und der Konformation der DNA ab.

Zu einer Elektrophoreseeinheit gehören ein mit 1x TBE – Puffer gefüllter Behälter, in dem sich die Gelmatrix befindet, und eine externe Spannungsquelle, die - mit dem Pufferbehälter verbunden - ein elektrisches Feld erzeugt. Um die DNA-Banden nach Auftrennung durch die Gelelektrophorese im Agarose- und Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, wird bei der Herstellung des Agarosegels der Agaroselösung Ethidiumbromid hinzugegeben; das Polyacrylamidgel wird nach der Elektrophorese für 2 Minuten in einer Lösung aus Aqua dest. und Ethidiumbromid inkubiert. Dieser mutagene fluoreszierende Farbstoff lagert sich zwischen den Basen der DNA ein und lässt anschließend unter einem UV-Transilluminator die so markierte DNA in einem orangefarbenen Licht erscheinen.

Bei der SSCP-Gelelektrophorese wurde dem PCR-Ansatz radioaktiver Phosphor ( $P^{33}$ ) hinzugegeben und das SSCP-Gel nach Elektrophorese mit einem Röntgenfilm für 48 Stunden inkubiert. Die so radioaktiv markierte DNA belichtete den Röntgenfilm entsprechend ihrem Bandenmuster und konnte nach Entwicklung des Röntgenfilms ausgewertet werden.

#### 2.4.1 Herstellung eines Polyacrylamidgels

Stammlösung		Ansatz für 4 Gele	
Zusatz:	Menge:	Zusatz:	Menge:
30 % Acrylamid	350 ml/l	Stammlösung	25,1 ml
10 x TBE	100 ml/l	25 % APS	150 µl
Glycerin	150 ml/l	TEMED	9 µl
H <sub>2</sub> O	400 ml/l		

Nachdem die Glasplatten der Gelkammer mit Ethanol gereinigt worden sind, wurde die Gelkammer ( Mini Protean II ) zusammengesetzt und der Gelansatz in die Kammer gegossen. Das Einbringen eines Plastikammes im oberen Teil führte nach Auspolymerisierung des Gels zur Ausbildung der Slottaschen. Danach wurde die Gelkammer in die Laufvorrichtung gestellt und mit 1x TBE- Laufpuffer befüllt. 10 µl des PCR-Ansatzes wurden jeweils in die Taschen pipettiert und anschließend die Gelelektrophorese bei einer angelegten Spannung von 240 Volt in 50 Minuten durchlaufen.

#### 2.4.2 Herstellung eines Agarosegels:

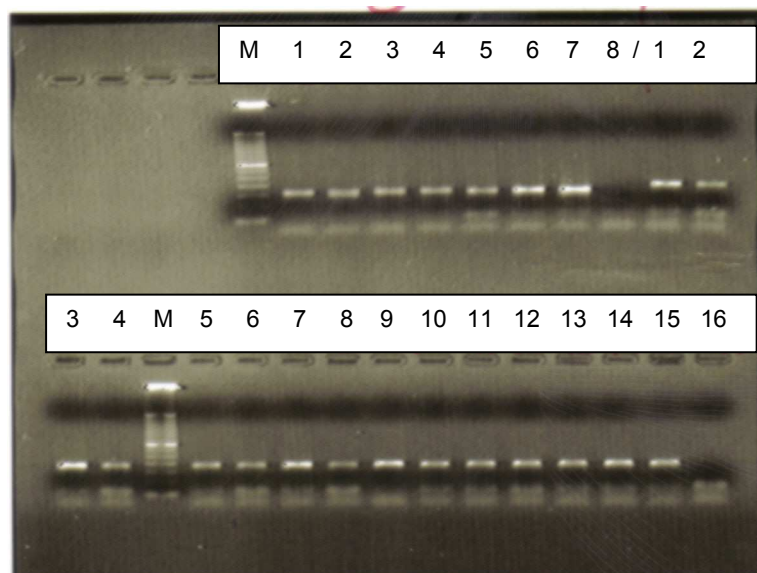
Zusatz	Menge
Agarosepulver	3,4 g
1x TBE	170 ml
Ethidiumbromid	15 µl

Nach kurzer Durchmischung des Agarosepulvers mit der 1x TBE-Lösung in einem Becherglas wurde das Gemisch für 2-3 Minuten in der Mikrowelle bei maximaler Wattleistung aufgeköcht. Anschließend wurde der Lösung Ethidiumbromid hinzugesetzt und nach kurzem Schütteln auf die zuvor mit Ethanol gereinigte Agarosegelkammer gegossen. Die dabei auftretenden Luftblasen wurden sofort entfernt, damit später die Laufeigenschaften der DNA-Moleküle nicht beeinflusst wurden.

Am Ende wurde im oberen Teil der Gellösung ein Plastikkamm eingesetzt, der die Geltaschen für die Proben bildete. Anschließend wurde die Gelkammer für 45 Minuten zum Trocknen der Gellösung unter einen Abzug gestellt.

Nach dem Trocknen des Agarosegels wurde die Gelkammer mit 1xTBE-Puffer aufgefüllt, so dass das fertige Agarosegel komplett mit 1xTBE-Puffer bedeckt war, und anschließend der Plastikkamm vorsichtig entfernt. Die so frei werdenden Geltaschen konnten nun mit jeweils 10 µl PCR-Produkt beladen werden. Als Längenkontrolle ließ man in eine Geltasche 10 µl eines 123 bp-Größenmarkers mitlaufen. Die angelegte Spannung betrug bei jeder Agarosegelelektrophorese 130 Volt, die Laufzeit immer 45 Minuten.

Die Auswertung des DNA-Laufes erfolgte unter einem UV-Transilluminator. Das sich hier zeigende Bandenmuster wurde zur Dokumentation abfotografiert, die entscheidenden DNA-Banden wurden anschließend mit einem Skalpell vorsichtig aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cup überführt und im Anschluss zur Sequenzanalyse vorbereitet (siehe Kapitel 2.5.5.).



**Abb.5: Repräsentatives Agarosegel**

Im Gel oben wurden PCR-Produkte mit Patienten-DNA aufgetragen (siehe Tasche 1-6) sowie mit Wildtyp-DNA (Tasche 7) und Wasser zur Kontrolle (Tasche 8). Im Gel oben hinten (Tasche 1 und 2) und im Gel unten wurden ebenfalls PCR-Produkte mit Patienten-DNA (Tasche 1-8 und 10-13) aufgetragen sowie mit Wildtyp-DNA (Tasche 14 und 15) und 123 bp Größenmarker (Tasche M) und einer Wasserkontrolle (Tasche 16).

### 2.4.3. Herstellung eines SSCP-Gels:

ohne Glycerin		mit Glycerin	
Zusatz:	Menge:	Zusatz:	Menge:
H <sub>2</sub> O	69 ml	H <sub>2</sub> O	64 ml
Glycerin	-	Glycerin	5 ml
SSCP-Serogel	25 ml	SSCP-Serogel	25 ml
10 x TBE	6 ml	10 x TBE	6 ml
25 % APS	160 µl	25 % APS	160 µl
TEMED	40 µl	TEMED	40 µl

Die Glasplatten der Vertikal-Gelkammer wurden zu Beginn gründlich mit Ethanol gereinigt und anschließend mit einer wasserabweisenden Arylease bestrichen, damit sich später die Gele nach der Elektrophorese besser von den Glasplatten ablösen ließen. Zwischen die Glasplatten wurde am linken und rechten Seitenrand jeweils ein 1,5 cm breiter und 1 mm dicker Spacer gelegt und durch die Haltevorrichtung am Seitenrand fixiert. Jetzt konnte nach dem Anbringen der Gießvorrichtung am unteren Ende der Glasplatten die zuvor gefertigte Gellösung mit einer 50 ml-Spritze in horizontaler Lage zwischen die Glasplatten gegossen werden. Zum Schluss wurden zwei Probenkämme mit jeweils 12 Probentaschen am oberen Ende der Glasplatten in die Gellösung gesteckt und für 3 Stunden zum Polymerisieren des Gels gelagert. Nach dem Auspolymerisieren der Gele wurden die Probenkämme und die untere Gießvorrichtung vorsichtig entfernt und die Glasplatten anschließend in die vertikale Haltevorrichtung gesteckt. Das Befüllen der Haltevorrichtung mit 1xTBE-Puffer und das Durchspülen der Probentaschen mit dem Puffer schlossen die Fertigstellung des SSCP-Gels ab.

In dieser Arbeit hat jedes PCR-Produkt jeweils ein SSCP-Gel mit und ohne Glycerin durchlaufen.

## **2.5. SSCP-Analyse (single strand conformation polymorphism)**

### **2.5.1. Grundprinzip der Methode**

Die SSCP (Einzelstrangkonnformationspolymorphismen)-Analyse ist eine sensitive und kostengünstige Methode, Mutationen und Polymorphismen in einem DNA-Abschnitt nachzuweisen, diese aber nicht näher zu beschreiben. Ob es sich bei der strukturellen Veränderung der DNA um zum Beispiel eine Punktmutation, Missense-Mutation, Splice-site-Mutation oder einen Polymorphismus handelt, lässt sich nur durch die DNA-Sequenzierung (Kapitel 2.6.) näher untersuchen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der SSCP-Analyse wurde nach Newton et al., 1994; Sheffield et al., 1993 und Orita et al., 1989 modifiziert.

Einzelsträngige DNA neigt dazu, sich zusammenzufalten und komplexe Strukturen zu bilden, die durch schwache intramolekulare Bindungen, vor allem durch Wasserstoffbrücken bei Basenpaaren, stabilisiert werden. Die elektrophoretische Beweglichkeit solcher Strukturen in nichtdenaturierten SSCP-Gelen hängt nicht nur von ihrer Kettenlänge und der Ladung ab, sondern auch von der Konformation, die durch die DNA-Sequenz bestimmt wird. Ein einziger Unterschied in der Basensequenz reicht aus, damit sich zwei Stränge unterschiedlich falten. Im SSCP-Gel zeigt sich diese Konformationsänderung durch eine veränderte Laufeigenschaft der Einzelstrang-DNA verglichen mit der Laufeigenschaft der Wild-Typ-DNA. Es kommt hierbei zu einer Verschiebung der DNA-Banden innerhalb des SSCP-Gels, den sogenannten „band-shifts“ (siehe Abb.6).

Die größte Sensitivität für die Ausbildung solcher Bandenshifts erreicht diese Methode bei Amplifikaten mit einer Basenpaarlänge von bis zu 300 bp. Steigern lässt sich die Empfindlichkeit, indem man bei der Herstellung des SSCP-Gels diesem 5%iges Glycerin hinzusetzt und damit den pH-Wert im Puffersystem erniedrigt. Polymorphismen lassen sich hierdurch bei Amplifikaten mit einer Länge von 450 bp mit 90-prozentiger Sicherheit und bei 300 bp mit bis zu 99-prozentiger Sicherheit nachweisen.

Da die Konformation eines DNA-Einzelstranges auch von der Temperatur, der Ionen- und Lösungsmittelkonzentration abhängt, sollten diese Parameter während der gesamten Gelelektrophorese konstant gehalten werden.

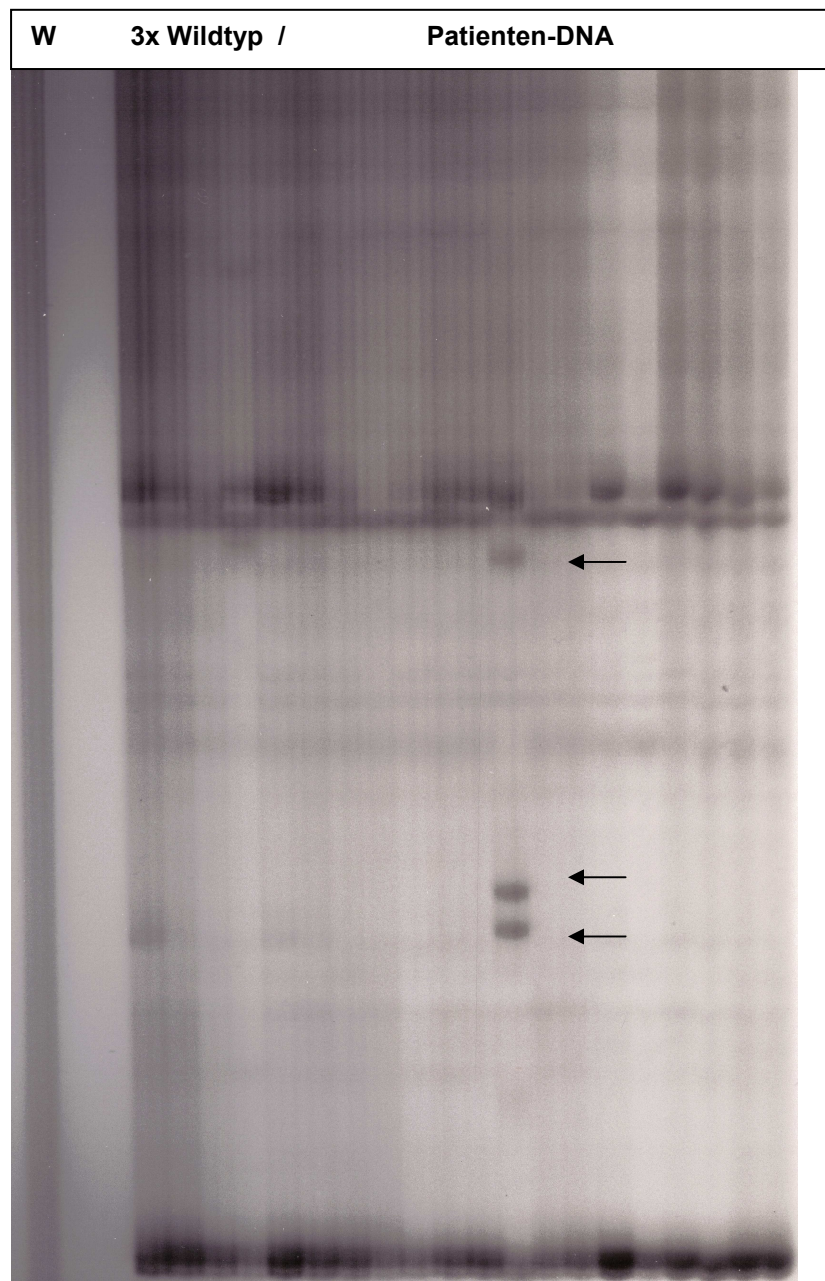
Um die Banden nach der Elektrophorese sichtbar zu machen und dadurch auswerten zu können, gibt es die Möglichkeit, das SSCP-Gel anschließend durch eine Silbernitratlösung anzufärben oder im Vorfeld die Markierung der PCR-Primer mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs oder Radioisotops durchzuführen.

### **2.5.2. Protokoll der SSCP-Analyse**

In dieser Arbeit wurden zu dem PCR-Reaktionsansatz 0,1 µl radioaktiv markierte <sup>33</sup>P-Nukleotide (<sup>33</sup>P-dTNPs) gegeben. Nach Amplifizierung wurde in jedes Eppendorf-Cup mit 10 µl PCR-Ansatz 5 µl einer Stopplösung pipettiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 96 °C wieder denaturiert, wodurch sich die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge auftrennten. Um eine Rückbildung zu verhindern, wurde der erhitzte Ansatz sofort nach Beendigung des Denaturierungsschrittes für 4 Minuten auf Eis gestellt. 10 µl des Ansatzes wurden jeweils in die Geltaschen des SSCP-Gels pipettiert und im Anschluss die Elektrophorese bei Raumtemperatur und einer angelegten Spannung von 5 Watt für 20 Stunden gestartet. Nach Beendigung des Laufes wurde das SSCP-Gel mit Hilfe eines DIN-A3 Filterpapiers von der Glasplatte der Gelkammer abgelöst und die freibleibende Oberseite des Gels durch Auflage einer dünnen Plastikfolie geschützt. Dann wurde das Gel samt Filterpapier und Plastikfolie für 4 Stunden im Vakuum getrocknet. Zum Schluss wurde das auf dem Filterpapier getrocknete Gel zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Filmkartusche gelegt und für 48 Stunden inkubiert.



Nach Entwicklung des Röntgenfilms konnte das Ergebnis der Gelelektrophorese abgelesen und das Bandenmuster der Patienten-DNA mit dem Bandenmuster der Wildtyp-DNA verglichen werden. Abweichungen im Bandenmuster waren verdächtig für das Vorliegen einer Mutation, eine genauere Untersuchung der aberranten Bande ließ sich mit Hilfe der DNA-Sequenzierung (siehe Kapitel 2.6.) erreichen.



**Abb.6: Röntgenbild einer SSCP-Analyse mit einem auffälligen Polymorphismus**

**Ganz links im Bild wurde eine Wasserkontrolle aufgetragen, danach 3 mal Wildtyp-DNA und in die übrigen Taschen Patienten-DNA.**

### 2.5.3. Gewinnung von DNA aus SSCP-Gelen

Der Röntgenfilm wurde nach Auswertung wieder in ursprünglicher Lage auf das SSCP-Gel zurückgelegt und anschließend mit einer sterilen Kanüle die vom Wildtyp abweichende Bande durch den Röntgenfilm hindurch im gesamten Umfang markiert. Mit einem sterilen Skalpell wurde die so markierte Bande mitsamt dem Filterpapier aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cup überführt. Nach Zugabe von 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O wurde die Probe für 12 Stunden bei einer Temperatur von 65 ° C im Wärmeschrank aufbewahrt und mehrfach geschüttelt.

### 2.5.4. Reamplifizierung der DNA

10 µl der so gewonnenen DNA-Lösung wurden mit dem folgenden PCR-Ansatz gemischt und reamplifiziert:

#### **Ansatz:**

FP	1,00 µl
RP	1,00 µl
dTNP	2,00 µl
DMSO	3,00 µl
10x Puffer	2,50 µl
H <sub>2</sub> O	5,25 µl
TAQ	<u>0,25 µl</u>
	<b><u>15 µl</u></b>

#### **PCR-Bedingungen:**

94°C --- AT°C --- 72°C

35 Zyklen

30 sec --- 30 sec --- 30 sec

Das entstandene PCR-Produkt wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch den UV-Transilluminator ausgewertet (siehe Kapitel 2.4.2.). Mit einem sterilen Skalpell wurden die aufgetrennten DNA-Banden unter UV-Licht vorsichtig aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorf-Cup überführt. Da UV-Licht selbst bei längerer Bestrahlungszeit zu Schäden an der DNA führen kann, sollte die Bestrahlungszeit hier möglichst kurz gehalten werden.

### 2.5.5. Aufreinigung der DNA

Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach dem QIAquick Gel Extraction Kit Protokoll der Firma Qiagen, Hilden. Im ersten Schritt wurde das Leergewicht des Eppendorf-Cups vom Gesamtgewicht des für jedes mit Agarose-DNA gefüllten Cups abgezogen und das verbliebene Restgewicht mit dem Faktor 3 multipliziert. Das Ergebnis entsprach dem Volumen an QG-Puffer, das dem Agarose-DNA enthaltenen Cup zugeführt wurde (1 mg = 1 µl). Damit sich das Agarosegel lösen konnte, wurde die Probe für 10 Minuten bei 50°C inkubiert und alle 2-3 Minuten geschüttelt. Eine gelbliche Färbung der Probe zeigte an, dass der für die DNA-Bindung an der QIAquick-Membran nötige pH-Wert von *kleiner gleich 7,5* erreicht war. Bei oranger oder violetter Färbung war der pH-Wert zu hoch und wurde durch Zugabe von 10 µl Natriumacetat (pH 5,0) erniedrigt, bis sich eine gelbliche Färbung einstellte. Das oben errechnete Restgewicht, mit dem Faktor 1 multipliziert (1 mg = 1 µl), ergab die Menge an Isopropanol, die der Probe jetzt zugeführt wurde. Eine QIAquick Membransäule wurde auf ein 2ml Sammelcup gesteckt, die Probe in die Membransäule geschüttet und für eine Minute bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die DNA hat bei diesem Vorgang an der Membransäule gebunden. Der Überstand aus dem Sammelcup wurde verworfen, die in der Membransäule verbliebene DNA durch eine erste Zugabe von 600 µl QG-Puffer und anschließende Zentrifugation bei 13 000 rpm für eine Minute und durch eine zweite Zugabe von 750 µl PE-Puffer und anschließende Zentrifugation für eine Minute bei 13 000 rpm gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde nochmals für 3 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert und die QIAquick Membransäule im Anschluss auf ein neues 1,5 ml Sammelcup gesteckt. Um die gewaschene DNA aus der Membransäule in das neue Sammelcup zu überführen, wurden im letzten Schritt 30 µl destilliertes H<sub>2</sub>O in die Membransäule pipettiert, und nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde wiederum für eine Minute bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die so vom Agarosegel gewaschenen DNA-Proben wurden entweder bei – 20°C tiefgefroren oder sofort für die DNA-Sequenzierung weiterverarbeitet (siehe Kapitel 2.6.).

## **2.6. DNA-Sequenzierung**

### **2.6.1. Grundprinzip der Methode**

Die DNA-Sequenzierung (nach Sanger et al., 1977) zeigt die genaue Basenabfolge innerhalb des DNA-Einzelstranges an und gibt dadurch – verglichen mit der Basenabfolge der Wildtyp-DNA – Rückschlüsse auf die Ursache eines zuvor im SSCP-Gel entdeckten Polymorphismus.

Grundsätzlich stehen drei verschiedene Methoden für die Sequenzierung zur Verfügung, die häufigste und auch in dieser Arbeit angewendete Methode ist die Didesoximethode oder auch „Kettenabbruchsynthese“ nach Sanger.

Bei der Didesoxisequenzierung werden während einer Polymerasekettenreaktion nach dem Zufallsprinzip fluoreszenzmarkierte Didesoxinukleotide (ddNTPs) in den neuen komplementären DNA-Strang mit Hilfe einer geeigneten DNA-Polymerase eingebaut. Durch Hitzedenaturierung werden DNA-Doppelstränge zuvor in Einzelstränge aufgetrennt und dienen als Matrize.

Die ddTNPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) sind den dTNPs sehr ähnlich; am wachsenden 3'-Kohlenstoffende, wo normalerweise das nächste Nukleotid mit Hilfe der Phosphordiesterbindung zwischen seinem 5'-Kohlenstoffatom und dem 3'-Kohlenstoffatom des zuvor eingebauten Nukleotids angehängt wird, fehlt dem ddTNP jedoch die 3'-Hydroxylgruppe, so dass an seinem 3'-Kohlenstoffatom keine weitere Phosphordiesterbindung mehr gebildet werden kann und die Synthese der DNA-Kette unmittelbar abbricht. Im Sequenzierungsansatz wählt man die Konzentration der ddTNPs so, dass sie in wesentlich geringeren Mengen vorliegen als die normalen dTNPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Hierdurch konkurrieren die ddTNP-Moleküle mit denen im Überschuss vorliegenden dTNPs um den Einbau in die wachsende DNA-Kette. Es kommt also entweder zu einer Kettenverlängerung oder zu einem Kettenabbruch. Da die Amplifikation mit nur einem Primer (Forward-Primer oder Reverse-Primer) angesetzt wird, vermehrt sich das PCR-Produkt nicht exponentiell, sondern linear.

Am Ende der Sequenzierungsreaktion ist eine Population von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten entstanden, die alle ein übereinstimmendes 5'-Ende besitzen (Wird durch die Primer festgelegt), sich am 3'-Ende jedoch unterscheiden, da der Einbau des jeweiligen ddTNP zufällig an einer der vielen möglichen Positionen erfolgt, die der spezifischen Base entspricht. Je nach Einbau eines Didesoxinukleotids (ddATP, ddCTP, ddGTP, oder ddTTP) werden von diesen auch unterschiedliche Fluoreszenzsignale abgegeben. Bei dem hier verwendeten ABI PRISM 310 Genetic Analyzer werden die unterschiedlich langen DNA-Amplifikate in einer Gelmatrix durch eine Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Laserstrahls, der die Gelmatrix abtastet, werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, je nach Markierung Licht verschiedener Farbe zu entsenden, die photometrisch erfasst wird. Die Daten werden vom Computer erfasst und durch das Computerprogramm ABI PRISM (Perkin Elmer) analysiert und als Elektropherogramm dargestellt.

#### **2.6.2. Protokoll**

##### **PCR-Ansatz für die Sequenzierung:**

1 µl Primer (Forward oder Reverse)  
4 µl Big Dye Terminator  
5 µl DNA (Nach Aufreinigung)

##### **PCR-Bedingungen der Sequenzierungsreaktion:**

96°C - 55°C - 60°C

25 x

10 sec - 5 sec - 4 min

Nach Beendigung der Sequenzierungsreaktion müssen die unterschiedlich langen Amplifikate noch von den übrigen Reagenzien gereinigt werden, damit es bei der Kapillarelektrophorese und Laserabtastung zu keinen Störreaktionen kommt. Dies geschieht mit Hilfe der **DNA-Fällung**:

In die Proben-Cups wurden jeweils 80 µl H<sub>2</sub>O (HPLC Steril) hinzupipettiert und durchgemischt, anschließend wurde der gesamte Inhalt in ein neues 0,5 ml Cup überführt. 10 µl Natriumacetat 3 M (pH-Wert 4,6) und 250 µl Ethanol 100 % wurden dem Cup hinzugefügt und nach Durchmischung für 25 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden dem Cup 250 µl Ethanol 70% hinzugegeben und die Mischung erneut für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert.

Nach Abpipettieren dieses Überstandes wurde das verbliebene Pellet für 10 Minuten in einer Speed-Vac getrocknet. Am Ende wurden 25 µl TSR-Puffer auf das Pellet pipettiert, die Probe in einem Heizblock bei 96°C für 4 Minuten denaturiert und die Reaktion auf Eis gestoppt. Jetzt konnte die Probe in den Sequenzer gestellt und das Programm gestartet werden.

## **2.7. Statistische Analyse**

Follow-up Ergebnisse wurden als Median aufgeführt. Die Daten wurden analysiert mit Hilfe der SPSS Version 10 (SPSS, Chicago, USA).

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Häufigkeit, Therapie und klinischer Verlauf von offenbar sporadischem pHPT oder PET**

Von den 15 Patienten mit pHPT waren acht Frauen und sieben Männer. Zum Diagnosezeitpunkt hatten sie ein mittleres Alter von 27 Jahren (Spannbreite 16 – 40 Jahre), zehn von ihnen waren jünger als 30 Jahre. Bei sieben völlig asymptomatischen Patienten wurde der pHPT zufällig durch einen Kalziumanstieg während einer Routineuntersuchung diagnostiziert. Alle 15 Patienten wurden operiert. Bei 13 Patienten war ein einzelnes Nebenschilddrüsenadenom Ursache der Hyperkalzämie. Dieses wurde nach der Standardmethode der bilateralen Halsdissektion operativ entfernt. Der histologische Befund bestätigte das Vorliegen eines Einzeladenoms bei allen 13 Patienten. Ein Patient erhielt eine 3-1/2-Resektion bei vier hyperplastischen Nebenschilddrüsen, die durch eine histologische Untersuchung ebenfalls abgesichert war. Alle diese Patienten blieben nach einer mittleren Folgeuntersuchung von 67 Monaten (Spannbreite 16 – 120 Monate) normokalzämisch.

Die letzte Patientin hatte bei Rezidiven insgesamt drei Operationen der Nebenschilddrüsen. Sie hatte sich vorher in einem anderen Krankenhaus zwei Adenome entfernen lassen. Das hatte eine vorübergehende Normokalzämie zur Folge. 24 Monate später tauchte ein Rezidiv auf. Eine dritte hyperplastische Nebenschilddrüse wurde daraufhin im gleichen Krankenhaus entfernt, wobei diesmal eine Normokalzämie für 48 Monate anhielt, bis sich ein neues symptomatisches Rezidiv mit einer Nephrolithiasis entwickelte. Während einer weiteren Operation am Institut des Autors wurde die vierte Nebenschilddrüse, die 0,8 Gramm wog und histologisch eine diffuse Hyperplasie zeigte, mit Hilfe der bilateralen zervikalen Thymektomie entfernt. Die Patientin blieb auch 6 Monate nach dieser Operation noch normokalzämisch unter der Substitution von Kalzium und Vitamin D3. Sie wurde ausgewählt für eine Autotransplantation von kryokonserviertem Gewebe.

Von den acht Patienten mit offenbar sporadischem, unifokalem PET waren fünf Frauen und drei Männer mit einem zum Diagnosezeitpunkt mittleren Alter von 31 Jahren (Spannbreite 20 – 40 Jahre); drei von ihnen waren jünger als 30 Jahre. Fünf Patienten hatten Insulinome, zwei litten unter einem Zollinger-Ellison-Syndrom (ZES) und ein Patient hatte einen nicht-funktionellen endokrinen Pankreastumor (NPT), der während einer Untersuchung wegen Abdominalschmerzen entdeckt wurden. Alle Patienten unterzogen sich einer Pankreasresektion. Insulinome wurden bei fünf Patienten bestätigt. Bei den zwei Patienten mit dem Zollinger-Ellison-Syndrom wurden Gastrinome in der Duodenalwand entfernt. Bei einem Patienten wurden gleichzeitig die Lymphknoten-Metastasen entfernt. Der Patient mit dem NPT unterzog sich außerhalb des Instituts einer Tumor-Enukleation und wurde anschließend mit einem Rezidiv wieder eingewiesen. Eine pyloruserhaltende Pankreatikoduodenektomie mit Lymphknotenentfernung wurde durchgeführt. Alle Patienten haben bis zum Ende der Studie nach einer medianen Nachbeobachtung von 42 Monaten (Spannbreite 12 – 161 Monate) überlebt; ein Patient litt unter Metastasen.

### **3.2. Daten der MEN I-Gen-Mutationsanalyse**

Das SSCP zeigte eine Bandenverschiebung bei drei Patienten mit pHPT. Dabei wurde mit der Wildtyp-DNA kontrolliert. Die Sequenzanalyse von den vervielfachten varianten Banden identifizierte drei Sequenzveränderungen.

Der Patient mit der 3-1/2-Resektion der Nebenschilddrüse zeigte eine Missense-Mutation in Exon 3, die einen Aminosäureaustausch von Cytosin für Tyrosin an der Nukleotid-Position 574 hatte (c.574C > T, S155F). Diese Missense-Mutation ist nicht als Polymorphismus bekannt (Tabelle 2 und Abb.1).

Die Patientin, welche drei Operationen bei pHPT-Rezidiven aufgrund einer asymmetrischen Vier-Nebenschilddrüsenhyperplasie hatte, zeigte eine Keimbahn-Splice-Site-Mutation IVS an der Intron 4 – Exon 5 – Bande (894-9G > A) (Tabelle 2 und Abb.2).

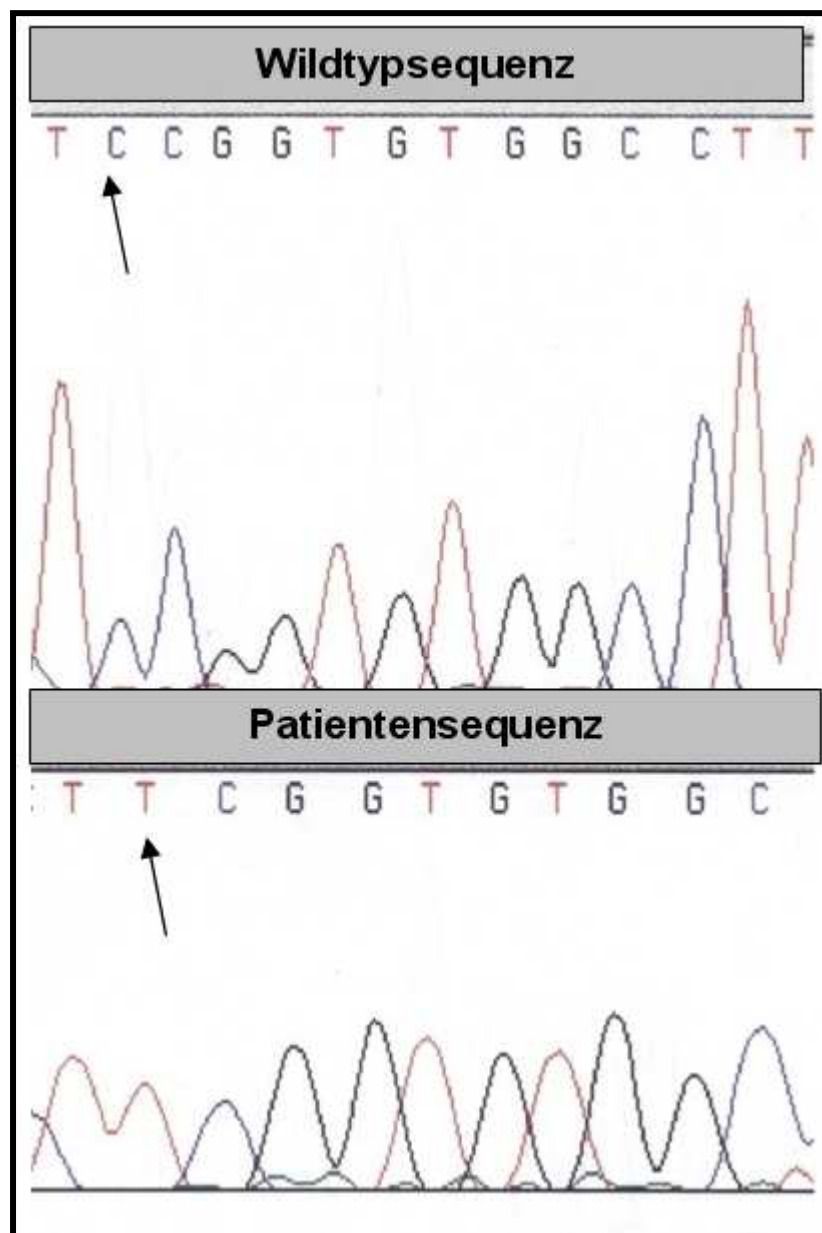


Eine 28 Jahre alte Patientin mit solitärem Adenom hatte einen Austausch von Cytosin durch Tyrosin an der Nukleotid-Position 545, welches nicht zu einem Aminosäurewechsel führte (c, 545C > T, S145S). Diese Sequenzveränderung ist ein bekannter MEN1-Polymorphismus (Tabelle 2 und Abb.3).

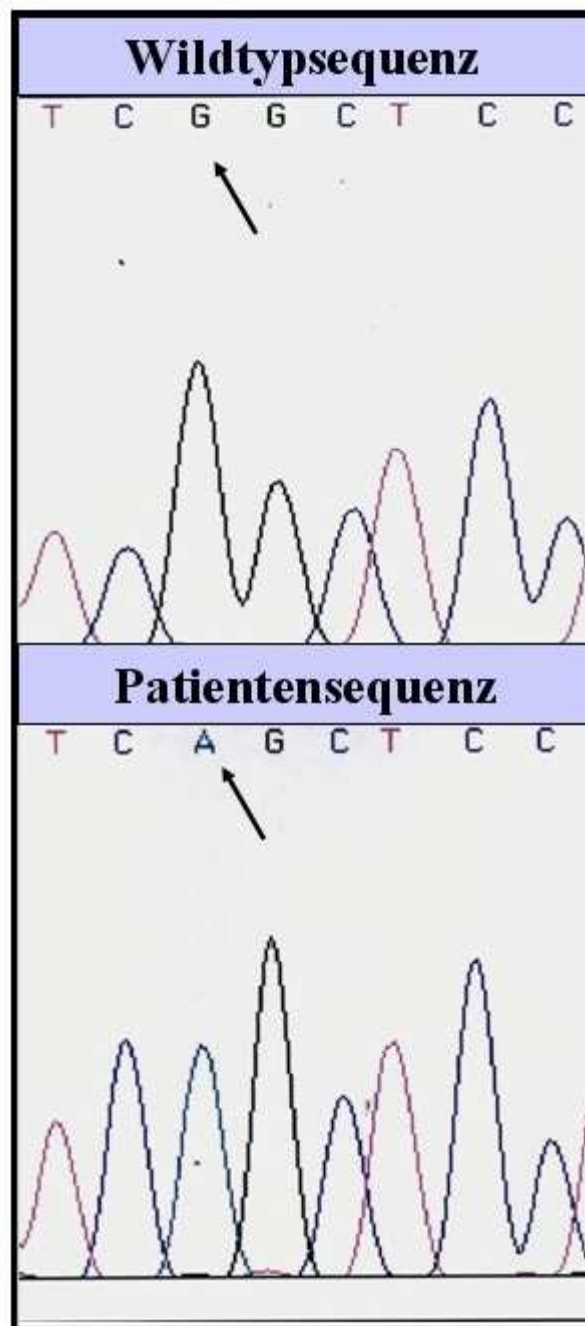
Die gesamte Prävalenz von Keimbahn-Mutationen bei Patienten mit pHPT betrug 13 Prozent (95 % Konfidenzintervall 1.6 zu 40.4). SSCP und DNA-Sequenzierung zeigten Wildtypsequenzen von MEN I – Genen bei allen Patienten mit PET (Prävalenz von Mutation 0 Prozent (95 % Konfidenzintervall 0 zu 36.9).

**Tabelle 2:** Patienten mit sporadischem pHPT und MEN-I Keimbahnmutationen oder Polymorphismus (eigene Ergebnisse)

<b>Geschlecht</b>	<b>Alter bei OP</b>	<b>Art der OP</b>	<b>Zahl vergrößerter Drüsen</b>	<b>Exon</b>	<b>Codon</b>	<b>Basen-Austausch</b>	<b>Aminosäure-Austausch</b>
M	34	3-1/2-Resektion	4	3	574	Cyt→Tyr	Missense-Mutation
W	29	3 OPs bei re-kurr.pHPT	4	Intron 4-Exon 5-Bande	894		Splice-Site-Mutation
W	28	bilaterale Halsexploration	solitäres Adenom	2	545	Cyt→Tyr	bekannt.MEN- I Polymorphismus



**Abb.1: Sequenzanalyse eines pHPT-Patienten mit Missense-Mutation**



**Abb.2: Sequenzanalyse eines pHPT-Patienten mit Splice-Site-Mutation**

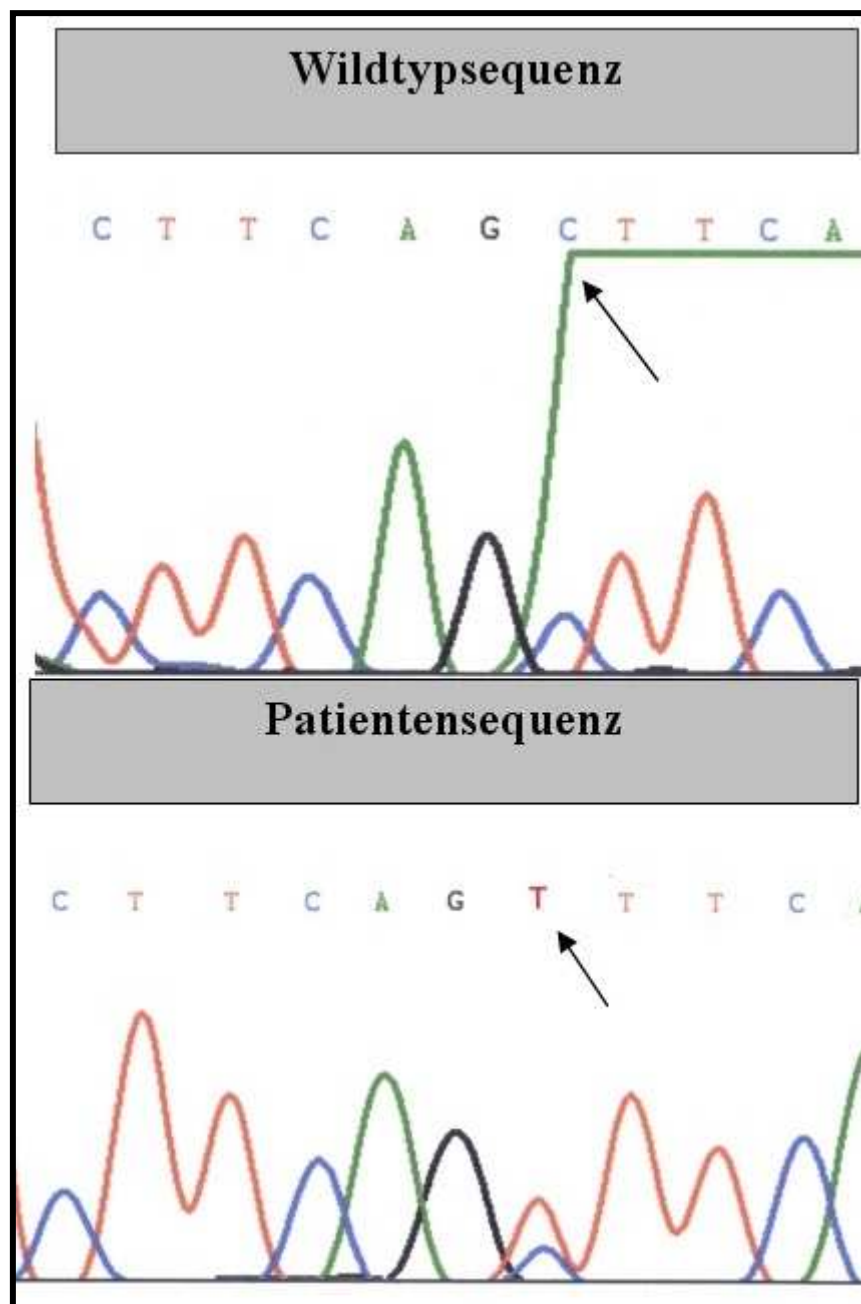


Abb.3: Sequenzanalyse eines pHPT-Patienten mit Polymorphismus

## 4. Diskussion

Das MEN I-Syndrom wird einerseits durch eine strenge Gewebespezifität charakterisiert und andererseits durch ein relativ breites Spektrum assoziierter Tumore und eine große klinische Variabilität. Die Prävalenz von MEN I kann unterschätzt werden, da bei der ersten Diagnose der meisten MEN I-Patienten nur ein solitäres Adenom beobachtet wird (Sheperd, 1991). Ein Konsens von Endokrinologen definiert einen MEN I-Fall als einen Patienten mit zwei oder drei MEN I-typischen endokrinen Tumoren (pHPT, PET und Hypophysenadenome). Bei einem Patienten mit familiärem MEN I-Syndrom, der einen Verwandten 1. Grades mit zwei oder mehr MEN I-verwandten Neoplasien aufweist, reicht das Vorhandensein einer typischen Organmanifestation für die Diagnose des MEN I aus (Brandi et al., 2001). Weitere wichtige Kriterien für die Diagnose von hereditärem MEN I sind das frühe Auftreten von MEN I-assoziierten Tumoren im Alter unter 40 Jahren und von multifokalen und rekurrenten Tumoren. Das typische Alter für das erste Auftreten von MEN I-assoziierten Tumoren gegenüber sporadischen Tumoren beträgt z.B. bei pHPT 25 Jahre gegenüber 55 Jahren und bei Gastrinomen 35 Jahre gegenüber 45 Jahren (Agarwal et al., 2004). Insgesamt gesehen kann es in Einzelfällen schwierig sein, das MEN I-Syndrom allein aufgrund klinischer Beweise zu diagnostizieren.

Die genetische Mutationsanalyse erlaubt eine eindeutige Diagnose von MEN I-Neoplasien in einem frühen Stadium sogar bei Patienten, die nicht die klinischen Kriterien erfüllen. Die Identifizierung von MEN I-Keimbahnmutationen hat wichtige Konsequenzen für den einzelnen Patienten, das gegenwärtige und zukünftige Klinikmanagement, einschließlich der operativen Behandlung und der jährlichen Überwachungsmethoden (biochemischer und radiologischer Untersuchungen), die bei Patienten mit MEN I-Syndrom und solchen mit sporadischen endokrinen Tumoren sehr variieren (siehe 1.1., 1.2. und 1.3.2.).

Alle bisher bekannten MEN I-Mutationen sind im Gegensatz zum MEN II-Syndrom nicht auf bestimmte Sequenzen des MEN I-Gens konzentriert, sondern verteilen sich über die gesamte kodierende Sequenz und Intronsequenzen (Marx et al., 1999; Bartsch et al., 1998; Giraud et al., 1998).

Die Analyse von MEN I-Mutationsträgern in einer MEN I-Familie beinhaltet die selektive Untersuchung einer für diese Familie spezifischen MEN I-Mutation. Im Falle nicht familiärer endokriner Tumoren ist die Mutationsanalyse weitaus zeitaufwändiger und teurer, auch wenn der Umfang der DNA-Sequenzierung durch vorausgegangene Einzelstrangkonnformationspolymorphismen-Analyse (SSCP), wie in der vorliegenden Studie, eingeschränkt wird. Deshalb werden Richtlinien für eine MEN I-Mutationsanalyse vorgeschlagen.

Ein Konsens von Endokrinologen empfiehlt MEN I-Mutationsanalysen bei Patienten mit multiplen endokrinen Tumoren der Nebenschilddrüsen, die vor dem 30. Lebensjahr auftreten, und bei wiederholt auftretendem Hyperparathyreoidismus und Gastrinomen in jedem Alter (Brandi et al., 2001). Die deutsche MEN I-Studiengruppe schlägt eine genetische Untersuchung von Patienten mit einer einzigen für MEN I-typischen endokrinen Neoplasie vor (pHPT, PET und Hypophysenadenom), wenn zusätzliche klinische Kriterien erfüllt sind, d.h. die Patienten unter 40 Jahre alt sind oder eine positive Familiengeschichte oder eine multifokale oder rezidivierende Neoplasie nachgewiesen werden kann (Karges et al., 2000). Solche Richtlinien für eine MEN I-Mutationsanalyse beruhen allerdings nur auf schwachen Beweisen. Während eine spezifische DNA-Analyse bei Patienten einer Familie mit bekanntem MEN I-Syndrom allgemein befürwortet wird, erscheint eine MEN I-Genanalyse aller Patienten mit sporadischen MEN I-typischen Tumoren (pHPT oder PET) nach Meinung verschiedener Autoren generell nicht gerechtfertigt (Cardinal et al., 2005; Cupisti et al., 2000).

Basierend auf den Daten der vorliegenden Studie schlagen wir klinische Kriterien zur Identifizierung von Risikopatienten vor, die von einer MEN I-Mutationsanalyse profitieren können.

In der vorliegenden Studie konnten wir einen früher beschriebenen MEN I-Polymorphismus bestätigen (c.545C > T,S145S) (Gortz et al., 1999 und Bassett et al., 1998) und so hier angewendete Methoden positiv bewerten. Entscheidender ist jedoch der Nachweis von MEN I-Keimbahnmutationen bei zwei von 15 Patienten mit scheinbar sporadischem pHPT, die jünger als 40 Jahre waren (13 %). Die Missense-Mutation in Exon 3 (c.574C > T,S155) ist nicht als Polymorphismus bekannt. Die Mutation in einer Splice-Sequenz (IVS 894 – 9G > A) an der Intron 4 – Exon 5 – Bande ist aufgrund früherer Daten mit MEN I assoziiert (Tsukada et al., 2000).

Durch diese Keimbahnmutationen kann entweder ein Funktionsverlust des Menins oder die Abwesenheit von Menin in jeder Körperzelle erwartet werden („first hit“). Nach einer anschließenden somatischen Mutation („second hit“) kann ein ähnlicher Tumorsuppressor-Mechanismus (infolge einer Inaktivierung beider Allele des MEN I-Gens) für die Entwicklung MEN I-assoziiierter Tumoren und einiger sporadischer endokriner Tumoren eine Rolle spielen (Marx, 2001).

Keimbahnmutationen wurden in der vorliegenden Studie nur bei zwei Patienten mit Vier-Nebenschilddrüsenkrankung nachgewiesen, während alle anderen Patienten mit solitärem Adenom der Nebenschilddrüsen MEN I-Wildtyp-Sequenzen zeigten. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein, die MEN I-Keimbahnmutationen auch bei jungen Patienten mit multiglandulärer Erkrankung gefunden haben (Cardinal et al., 2005; Cupisti et al., 2000).

Ein Vergleich der vorliegenden Daten mit den Ergebnissen anderer Autoren ist nur eingeschränkt möglich, weil die Patienten in anderen Studien bei der Diagnose in Bezug auf das Alter unselektiert waren (Cardinal et al., 2005; Uchino et al., 2000), während alle hier untersuchten Patienten 40 Jahre oder jünger waren.

In einer japanischen Studie mit Patienten mit scheinbar sporadischem pHPT wurden MEN I-Keimbahnmutationen nur bei drei von 64 Patienten identifiziert (5 %)

(Uchino et al., 2000), von denen nur ein Patient eine Vier-Nebenschilddrüsenkrankung zeigte. Diese von der vorliegenden Studie abweichenden Ergebnisse lassen sich zum Teil damit erklären, dass der Anteil der MEN I-Familien an der japanischen Bevölkerung aufgrund früherer Studien deutlich niedriger ist als in Europa und den USA (Marx et al., 1998; Giraud et al., 1998; Bassett et al., 1998; Hai et al., 1998; Sato et al., 1998).

Cardinal und Mitarbeiter (2005) untersuchten australische Patienten mit sporadischem pHPT, die entweder unter 30 Jahre alt waren oder eine multiglanduläre Hyperplasie aufwiesen. Sie fanden MEN I-Keimbahnmutationen bei einem von 11 untersuchten Fällen (9 %) mit sporadischem pHPT.

Insgesamt gesehen erklärt sich die höhere Prävalenz von MEN I-Keimbahnmutationen (13 %) bei jungen Patienten mit sporadischem pHPT in der vorliegenden Studie wahrscheinlich dadurch, dass gerade junge Patienten im Alter bis zu 40 Jahren zu den Risikopatienten für MEN I gehören, d.h. zu den MEN I-Mutationsträgern. Trotz der geringen Fallzahlen sprechen die vorliegenden Daten dafür, dass MEN I-Mutationsanalysen bei Patienten mit scheinbar sporadisch auftretenden Tumoren nur dann gerechtfertigt sind, wenn der Patient jünger als 40 Jahre ist und einen pHPT aufgrund einer multiglandulären Erkrankung aufweist.

Analog zu diesen Befunden wurden kürzlich MEN I-Keimbahnmutationen bei Patienten mit familiärem isoliertem HPT (FIHP) nachgewiesen, einer milden Variante des MEN I-Syndroms. Diese MEN1-Mutationsträger waren zum Zeitpunkt der Diagnose 20 Jahre alt und zeigten eine multiple Hyperplasie der Nebenschilddrüsen (Cardinal et al., 2005).

Weitaus häufiger als MEN I-Keimbahnmutationen wurden somatische MEN I-Mutationen (annähernd 20 %) im Zusammenhang mit vielen sporadischen endokrinen Tumoren beschrieben, z.B. bei pHPT (Heppner et al., 1997), Gastrinomen und Insulinomen (Zhuang et al., 1997a) und bronchialen Karzinoiden (Debelenko et al., 1997). Das weist darauf hin, dass eine MEN I-Inaktivierung auch



ausschließlich durch somatische Mutationen (d.h. zwei erworbene Gendefekte, die unabhängig voneinander in Körperzellen auftreten) an der Tumorentstehung einiger sporadischer endokriner Tumoren beteiligt sein kann.

Heppner und Mitarbeiter (1997) haben zum Beispiel somatische MEN I-Mutationen bei 7 von 33 Patienten (21 %) mit sporadischem pHPT nachgewiesen. Andere Autoren fanden somatische MEN I-Mutationen bei 6 von 45 Patienten (13 %) bzw. bei 6 von 49 Patienten (12 %) mit sporadischem pHPT (Farnebo et al., 1998 und Carling et al., 1998) (Tabelle 3).

Typischerweise zeigten sporadische (nicht familiäre) pHPT und PET nahezu doppelt so häufig einen Verlust der Heterozygotizität (LOH) (bezogen auf die Allele des MEN I-Tumorsuppressorgens 11q13) wie somatische MEN I-Mutationen (siehe Tabelle 3 und 4). Das spricht dafür, dass ein anderes Tumorsuppressorgen auf dem Chromosom 11 durch somatische Mutationen inaktiviert werden kann. Bisherige Untersuchungen konnten diese Annahme noch nicht bestätigen (Chakrabarti et al., 1998).

**Tabelle 3: MEN I-Genmutationen bei sporadischem pHPT – Literatur**

Referenz	Jahr	pHPT-Patienten	LOH 11q13	MEN I-Genmutation
Cardinal et al.	2005	11	n.u.*	1 Keimbahn- (9 %)
Uchino et al.	2000	64	3	3 Keimbahn- (5 %)
Farnebo et al.	1998	45	13	6 somatische (13 %)
Carling et al.	1998	49	13	6 somatische (12 %)
Heppner et al.	1997	33	7	7 somatische (21 %)

n.u.\* nicht untersucht

Da pankreatikoduodenale Tumore (PET) aufgrund früherer Studien möglicherweise die Erstmanifestation bei bis zu 30 % der Patienten mit MEN I sind (Langer et al., 2001; Carty et al., 1998; Skogseid et al., 1996), könnte eine Inaktivierung des MEN I-Tumorsuppressorgens auch in der Pathogenese sporadischer PET eine Rolle spielen.

In dieser Studie haben wir bei keinem der 8 untersuchten Patienten mit scheinbar sporadischem PET eine MEN I-Keimbahnmutation gefunden. Obwohl nicht auszuschließen ist, dass die SSCP-Technik eine Mutation übersehen haben kann, ist dieser Befund wenigstens mit einem früher publizierten Ergebnis zu vereinbaren. Cupisti und Mitarbeiter (2000) konnten keine MEN I-Mutationen bei 27 Patienten mit sporadischen Insulinomen finden, die zum Operationstermin in Bezug auf das Alter unselektiert waren (Median 46 Jahre bei einer Spannweite von 16 – 76 Jahren). In der vorliegenden Studie wurden nur junge Patienten im Alter von 40 Jahren oder jünger untersucht, die überwiegend sporadische Insulinome, aber auch Gastrinome, ZES und nicht-funktionelle PET zeigten.

Auf der anderen Seite wurden in früheren Studien somatische MEN I-Mutationen bei 2 von 12 (17 %) sporadischen Insulinomen und bei 9 von 27 (33 %) sporadischen Gastrinomen (Zhuang et al., 1997a) nachgewiesen (siehe Tabelle 4). In Übereinstimmung damit fanden Goebel und Mitarbeiter (2000) 16 somatische MEN I-Mutationen bei 51 sporadischen Gastrinomen (31 %). Andere Autoren untersuchten verschiedene sporadische benigne und maligne PET und beobachteten somatische MEN I-Mutationen bei 12 von 31 PET (39 %) (Wang et al., 1998) bzw. bei 3 von 11 überwiegend malignen nicht-funktionellen PET (27 %) (Hessman et al., 1998). Unterschiede in der Häufigkeit der publizierten MEN I-Mutationen erklären sich dadurch, dass unterschiedliche Tumortypen der PET untersucht wurden und eventuell kleine Unterschiede in den Techniken der Mutationsanalyse bestanden.

**Tabelle 4: MEN I-Genmutationen bei sporadischen PET – Literatur**

Referenz	Jahr	PET-Patienten	LOH 11q13	MEN1-Genmutation
Cupisti et al.	2000	27 Insulinome	n.u.*	keine
Zhuang et al.	1997a	12 Insulinome	6	2 somatische (17 %)
Shan et al.	1998	4 Insulinome	n .u.*	1 somatische (25 %)
Goebel et al.	2000	51 Gastrinome	n.u.*	16 somatische (31 %)
Zhuang et al.	1997a	27 Gastrinome	25	9 somatische (33 %)
Wang et al.	1998	31 PET**	12	12 somatische (39 %)
Hessman et al.	1998	11 PET***	3	3 somatische (27 %)

\* nicht untersucht

\*\* Wang et al. untersuchten 31 sporadische benigne und maligne PET

\*\*\* Hessman et al. untersuchten 11 sporadische maligne PET, d.h. 9 nicht-funktionelle Tumoren und 2 Glukagonoma

Aus den eigenen Ergebnissen schließen wir, dass MEN I-Keimbahnmutationen bei der Pathogenese sporadischer Insulinome keine kritische Rolle spielen können. Im Gegensatz zu Zhuang und Mitarbeitern (1997a) konnten wir keine spezifische Untergruppe von Insulinomen charakterisieren, für deren Entwicklung MEN I-Mutationen wichtig sein könnten.

Die vorliegenden Daten sprechen übereinstimmend mit früheren Ergebnissen von Cupisti und Mitarbeitern (2000) dafür, dass junge Patienten mit scheinbar sporadischen unifokalen Insulinomen wahrscheinlich nicht von einer MEN I-Mutationsanalyse profitieren. Frühere Daten haben außerdem gezeigt, dass scheinbar sporadische unifokale Insulinome selten einer MEN I-Erkrankung zuzuordnen sind, auch wenn sie zu einem frühen Zeitpunkt auftreten (Kopp et al., 2001). Insulinome zeigen gewöhnlich einen benignen Verlauf und können in den meisten Fällen durch Resektion geheilt werden.

Dagegen haben Gastrinome ein höheres malignes Potential; in 90 % der Fälle entwickeln sich Lymphknoten und Lebermetastasen und nur 30 % der Fälle können auf längere Sicht geheilt werden (Zhuang et al., 1997a). Dementsprechend wurden somatische MEN I-Mutationen in lokalisierten und metastasierten sporadischen

Gastrinomen mit höherer Prävalenz gefunden als in sporadischen Insulinomen (Zhuang et al., 1997a und Tabelle 4). Zhuang und Mitarbeiter (1997a) identifizierten außerdem eine MEN I-Keimbahnmutation bei einem Patienten mit scheinbar sporadischem Zollinger-Ellison-Syndrom (ZES) mit negativer Familiengeschichte für MEN I. Eine Studie hat gezeigt, dass ZES bei einem Drittel von 28 MEN I-Patienten als Erstmanifestation auftrat und sich pHPT und Hypophysenadenome erst Jahre später entwickelten (Benya et al., 1994). Da 20 – 25 % der Patienten mit ZES eine MEN I-Erkrankung haben und ihre klinische Behandlung sich deutlich von derjenigen anderer Patienten mit sporadischem ZES unterscheidet, könnte eine MEN I-Mutationsanalyse auch für Patienten mit scheinbar sporadischem ZES wichtig sein. Während Patienten mit sporadischem ZES heute meist medikamentös behandelt werden, um die Hypersekretion von Gastrin effektiv und kontinuierlich zu hemmen (Quatrini et al., 2005), kann der Befund einer MEN I-Keimbahnmutation zur Operation dieser Patienten führen, wenn sich bei einem scheinbar sporadischem ZES nachträglich ein pHPT oder Hypophysentumor entwickelt. Es bleibt die Aufgabe großer prospektiver Studien festzustellen, ob junge Patienten mit scheinbar sporadischem ZES sich einer MEN I-Genanalyse unterziehen sollten. Bei anderen sporadischen MEN I-typischen Tumoren wurden somatische MEN I-Mutationen in unterschiedlicher Häufigkeit gefunden; z.B. zeigten 4 von 11 (36 %) Patienten mit sporadischen Lungenkarzinoiden somatische MEN I-Mutationen (Debelenko et al., 1997). Dagegen hatten sporadische Hypophysentumoren selten somatische MEN I-Mutationen (Poncin et al., 1999; Tanaka et al., 1998; Prezant et al., 1998; Zhuang et al., 1997b), so dass eine Inaktivierung des MEN I-Gens für die Entwicklung sporadischer Adenome der Hypophyse keine wichtige Rolle zu spielen scheint. Unterschiede in der Häufigkeit somatischer MEN I-Mutationen bei verschiedenen sporadischen MEN I-typischen Tumoren sprechen dafür, dass das MEN I-Gen in unterschiedlichem Maße neben anderen Genen in die Pathogenese sporadischer MEN I-verwandter Tumoren involviert ist. Es ist bekannt, dass Cyclin D1 / PRAD1 als aktiviertes Onkogen und Regulator des Zellzyklus an der Entwicklung sporadischer Nebenschilddrüsen-Adenome beteiligt ist (Arnold et al., 2002).

In der Literatur haben nur wenige Autoren Genotyp-Phänotyp-Beziehungen für MEN I-assoziierte PET und Nebennierentumoren vorgeschlagen (Bartsch et al., 2000; Langer et al., 2002). In ihren Untersuchungen fanden sie aggressivere Verlaufsformen der MEN I beim Vorliegen von trunkierenden Mutationen in den Exons 2, 9 und 10. Bei diesen Risikopatienten kann man ein radikaleres operatives Vorgehen rechtfertigen, während bei milderer Verlaufsformen MEN I-assoziiierter PET und asymptomatischen Patienten ein regelmäßiges klinisches Überwachungsprogramm ausreichen kann.

Nebennierentumoren treten deutlich häufiger auf bei Patienten mit den oben genannten trunkierenden Mutationen. Kleine und nicht-funktionelle Läsionen erfordern eine klinische Überwachung, während bei deutlich malignem Potential eine Operation indiziert ist, wenn die Tumorgöße 3 cm erreicht hat.

Im Gegensatz dazu haben Goebel und Mitarbeiter (2000) keine klare Korrelation zwischen einem spezifischen Mutationstyp und den klinischen Kriterien ihrer Patienten mit Gastrinomen, der Größe und dem Wachstumsmuster von Gastrinomen, beobachtet. Ihre Daten zeigen, dass durch Gegenwart oder Abwesenheit von somatischen MEN I-Mutationen keine Identifizierung klinisch wichtiger Untergruppen von Gastrinomen mit unterschiedlichem Wachstumsmuster möglich war. Obwohl andere Autoren eine Häufung trunkierender Mutationen um das Exon 2 des MEN I-Gens einräumen (Agarwal et al., 2004), können sie keine klaren Genotyp / Phänotyp - Beziehungen für MEN I-assoziierte Tumoren nachweisen. Aufgrund ihrer klinischen Daten kann die Gegenwart oder der Typ einer somatischen MEN I-Mutation nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung und der Tumoraggressivität korreliert werden und hat keine Bedeutung für die individuelle Risikoabschätzung bzw. klinische Prognose (Schussheim et al., 2001; Marx et al., 1999).

Andererseits sind phänotypische Varianten des MEN I-Syndroms bei mehreren großen Familien beschrieben worden. Zum Beispiel stellt eine Untergruppe der Familien mit isoliertem Hyperparathyreoidismus (FIHP), die eine Missense-Mutation im MEN I-Gen aufweist, eine milde Variante des MEN I-Syndroms dar (Kassem et al., 2000). Zusätzlich hat man eine Nonsense-Mutation im MEN I-Gen in 4 Familien aus

Neufundland nachgewiesen, die für ein Übergewicht an Prolaktinomen bei MEN I-assoziierten Hypophysentumoren verantwortlich gemacht wird (Olufemi et al., 1998).

Obwohl seit der Identifizierung des MEN I-Gens in 1997 viele genetische Studien durchgeführt wurden, sind viele Fragen zum MEN I-Syndrom noch offen. Die hohe Frequenz von trunkierenden und wahrscheinlich inaktivierenden MEN I-Mutationen (80 % aller registrierten Keimbahnmutationen) bestätigt die Hypothese, dass MEN I ein Tumorsuppressorgen ist (Agarwal et al., 2004).

Die Funktionen des Menins, seine Bindungspartner und seine Bedeutung in normalem Gewebe und in Tumoren sind noch weitgehend unbekannt. Menin scheint mit Hilfe seiner Bindungspartner (JunD, NF-kappa-B und Smad3 und anderen) regulierend in die Transkription und Apoptose einzugreifen und in der Zellwachstumsregulation, Zellzykluskontrolle und bei der Aufrechterhaltung der Genomstabilität eine Rolle zu spielen (Poisson et al., 2003). Tiermodelle, in denen ein Allel des MEN I-Gens durch homologe Rekombination inaktiviert wird, wie die Knock-out-Maus (Crabtree et al., 2001), bieten neue Möglichkeiten, die Pathophysiologie von MEN I zu untersuchen und aufzuklären.

Eine präoperative MEN I-Mutationsanalyse wird bei Patienten mit scheinbar sporadischem pHPT allgemein empfohlen, weil eine Unterscheidung zwischen sporadischem und MEN I-assoziiertem pHPT in einem frühen Stadium aufgrund klinischer Kriterien schwierig, jedoch für die operative Therapie entscheidend ist (Cardinal et al., 2005; Uchino et al., 2000). Allerdings erscheint eine routinemäßig durchgeführte Genanalyse für alle Patienten mit scheinbar sporadischem pHPT wegen der hohen Kosten nicht gerechtfertigt. Deshalb schlagen wir eine MEN I-Genanalyse nur für Risikopatienten vor, die im Alter unter 40 Jahren erkranken und eine multiglanduläre Hyperplasie der Nebenschilddrüsen zeigen.

Die SSCP-Analyse (single strand conformational polymorphism analysis) wurde in mehreren Studien als spezifische und empfindliche Methode beschrieben, mit deren Hilfe mehr als 85 % aller Mutationen detektiert werden können (Bassett et al., 1998; Bartsch et al., 1998; Agarwal et al., 1997).

Andererseits ist die DNA-Sequenzierung dadurch limitiert, dass 10 – 20 % aller MEN I-Keimbahnmutationen mit gängigen Methoden nicht erfasst werden, d.h. bis zu 20 % der MEN I-Patienten keine Mutation in der kodierenden Sequenz oder Intronsequenzen des MEN I-Gens zeigen (Marx, 2001; Mutch et al., 1999; Teh et al., 1998; Bassett et al., 1998; Agarwal et al., 1997). Das kann man damit erklären, dass sich die Mutationen außerhalb des untersuchten Bereichs in der nicht kodierenden Sequenz des Gens befinden (z.B. im Promoter oder nicht translatierten Bereichen im 5'- und 3'-Terminus). Allerdings wurde bisher noch keine Sequenzänderung in der Promotor-Region des MEN I-Gens für familiäre und sporadische Fälle identifiziert (Cardinal et al., 2005). Es ist auch möglich, dass Verluste eines Chromosomenanteils, der größer als ein Exon ist, übersehen werden können, weil nur die normale Kopie des entsprechenden MEN I-Exons mittels PCR vervielfältigt wird.

Theoretisch kann die frühe Diagnose mittels MEN I-Gensequenz-Analyse bei Risikopatienten mit sporadischen MEN I-typischen endokrinen Tumoren ebenso wie bei asymptomatischen MEN I-Familien das klinische Überwachungsprogramm und die operative Therapie dieser Patienten verbessern. Das kann zur rechtzeitigen Linderung, wenn auch nicht Heilung, potentiell schwerer Krankheitsverläufe mit malignen Tumoren (Gastrinomen, nicht-funktionellen PET oder anderen) beitragen. In der klinischen Praxis führt jedoch der Befund eines MEN I-Mutationsträgers nur bei Patienten mit sporadischem pHPT zu therapeutischen Interventionen (Doherty et al., 2004; Goudet et al., 2001; siehe 1.3.2.). Prophylaktische Verfahren, wie sie beim MEN II-Syndrom erfolgreich etabliert sind, sind bei MEN I noch kaum untersucht. Es fehlen prospektive klinische Studien, die einen klinischen Nutzen und Überlebensvorteil durch eine präklinische Diagnosestellung, gefolgt von prophylaktischen Operationen von PET belegen. Zukünftige klinische Langzeitstudien müssen außerdem zeigen, ob eine genetische Mutationsanalyse die Prognose von MEN I-Patienten verbessern und die MEN I-assozierte Mortalität reduzieren kann.

## 5. Zusammenfassung

Die geeignete Behandlung eines sporadischen endokrinen Tumors kann sich von derjenigen eines Tumors erheblich unterscheiden, der als Teil eines MEN I-Syndroms auftritt. Da primärer Hyperparathyreoidismus (pHPT) und pankreatikoduodenale Tumore (PET) die häufigsten Organmanifestationen des MEN I-Syndroms sind, wurde die Prävalenz von Keimbahnmutationen des MEN I-Gens bei jungen Patienten mit scheinbar sporadischem pHPT und PET bestimmt.

Achtzehn von 705 Patienten mit pHPT und 11 von 93 Patienten mit PET, die zwischen 1987 und 2001 operiert wurden, hatten keine Familiengeschichte von MEN I, nur eine Organmanifestation und waren zum Zeitpunkt der Diagnose 40 Jahre alt oder jünger. Fünfzehn Patienten mit pHPT und 8 Patienten mit PET stimmten einer MEN I-Gen-Mutationsanalyse zu, die mit Hilfe einer Einzelstrangkonnformationspolymorphismenanalyse und direkter DNA-Sequenzierung durchgeführt wurde.

Zwei von 15 Patienten (13,3 % (95 % Konfidenzintervall (c.i.) 1,6 – 40,4)) mit scheinbar sporadischem pHPT hatten eine MEN I-Keimbahnmutation. Beide Mutationen wurden bei Patienten mit pHPT aufgrund einer Vierdrüsenerkrankung gefunden, während die restlichen 13 Patienten ein solitäres Adenom aufwiesen. Keiner der 8 Patienten mit PET zeigte eine MEN I-Keimbahnmutation.

Vermeindlich sporadischer pHPT, dem eine Vier-Nebenschilddrüsenerkrankung zugrunde liegt, kann bei Patienten unter 40 Jahren trotz negativer Familiengeschichte die erste Organmanifestation des MEN I-Syndroms darstellen. Aufgrund der vorliegenden Daten sind MEN I-Mutationsanalysen nur bei diesen Risikopatienten mit scheinbar sporadischem pHPT gerechtfertigt, während junge Patienten mit sporadischen unifokalen Insulinomen wahrscheinlich nicht von einer genetischen Analyse profitieren.



## 6. LITERATUR

Adami,N.S., Marcocci,C., Gatti,D.: Epidemiology of primary hyperparathyroidism in Europe.

J Bone Miner Res 17 (2): N18-N23, (2002)

Agarwal, S.K., Kester, M.B., Debelenko, L.V., Heppner, C., Emmert-Buck, M.R., Skarulis, M.C., Doppman, J.L., Kim, Y.S., Lubensky, I.A., Zhuang, Z., Green, J.S., Guru, S.C., Manickam, P., Olufemi, S.E., Liotta, L.A., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., Burns, A.L, Marx, S.J.: Germline mutations of the MEN I gene in familial multiple endocrine neoplasia type 1 and related states.

Hum Mol Genet 6: 1169-1175, (1997)

Agarwal, S.K., Guru, S.C., Heppner, C., Erdos, M.R., Collins, R.M., Park, S.Y., Saggart, S., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., Marx, S.J. und Burns, A.L.: Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription.

Cell 96: 143-152, (1999)

Agarwal, S.K., Burns, A.L., Sukhodolets, K.E., Kennedy, P.A., Obungu, V.H., Hickman, A.B., Mullendore, M.E., Whitten, I., Skarulis, M.C., Simonds, W.F., Mateo, C., Crabtree, J.S., Scacheri, P.C., Youngmi, J.I., Novotny, E.A., Garrett-Beal, L., Ward, J.M., Lubutti, S.K., Alexander, H.R., Cerrato, A., Parisi, M.J., Santa Anna-A., S.und Oliver, B.: Molecular pathology of the MEN I gene.

Ann N Y Acad Sci 1014: 189-198, (2004) Review

Akerström, G., Hessman, O., Skogseid, B.: Timing and extent of surgery in symptomatic and asymptomatic neuroendocrine tumors of the pancreas in MEN I.

Langenbecks Arch Surg 386: 558-569, (2002)

Arnold, A., Shattuck, T.M., Mallya, S.M., Krebs, L.J., Costa, J., Gallagher, J., Wild, Y., und Saucier, K.: Molecular pathogenesis of primary hyperparathyroidism.

J Bone and Mineral Research 17(2): N30-N36, (2002)

Bartsch, D., Kopp, I., Bergenfelz, A., Rieder, H., Münch, K., Jäger, K., Deiss, Y., Schudy, A., Barth, P., Arnold, R., Rothmund, M., und Simon, B.: MEN I gene mutations in 12 MEN I families and their associated tumors.

Eur J Endocrinol 139: 416-420, (1998)

Bartsch, D.K., Langer, P., Wild, A., Schilling, T., Celik, I., Rothmund, M., Nies, C.: Pancreaticoduodenal endocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1: surgery or surveillance?

Surgery 128: 958-966, (2000)

Bartsch, D.K., Fendrich, V., Langer, P., Celik, I., Rothmund, M.:

Outcome of duodenopancreatic resections in patients with multiple endocrine neoplasia type I.

Ann Surg 242: 757 (2005)

Bassett, J.H., Forbes, S.A., Pannett, A.A., Lloyd, S.E., Christie, P.T., Wooding, C., Harding, B., Besser, G.M., Edwards, C.R., Monson, J.P., Sampson, J., Wass, J.A., Wheeler, M.H., Thakker, R.V.: Characterization of mutations in patients with multiple endocrine neoplasia type I.

Am J Hum Genet 62(2): 232-244, (1998)

Benson, L., Ljunghall, S., Akerstrom, G., Oberg, K.: Hyperparathyroidism presenting as the first lesion in multiple endocrine neoplasia type I.

Am J Med 82: 731-737, (1987)

Benya, R.V., Metz, D.C., Venzon, D.J., Fishbeyn, V.A., Strader, D.B., Orbuch, M., und Jensen, R.T.: Zollinger-Ellison syndrome can be the initial endocrine manifestation in patients with multiple endocrine neoplasia type I.

Am J Med 97: 436-444, (1994)

Brandi, M.L., Gagel, R.F., Angeli, A., Bilezikian, J.P., Beck-Peccoz, P., Bordi, C., Conte-Devolx, B., Falchetti, A., Gheri, R.G., Libroia, A., Lips, C.J.M., Lombardi, G., Mannelli, M., Pacini, F., Ponder, B.A.J., Raue, F., Skogseid, B., Tamburrano, G., Thakker, R.V., Thompson, N., Tomassetti, P., Tonelli, F., Wells, S.A. und Marx, S.J.: Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type I and type II.

J Clin Endocrinol Metab 86(12): 5658-5671, (2001)

Buchanan, K.D., Johnston, C.F., O'Hare, M.M., Ardill, J.E., Shaw, C., Collins, J.S.,: Neuroendocrine tumours. A European review.

Am J Med 81: 14-22 (1998)

Burgess, J.R., Greenaway, T.M., Shepherd, J.J.: Expression of the MEN-I gene in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type I.

J Intern Med 243: 465-470, (1999)

Caneiro, D.M., Solorzano, C.C., Irvin, G.L.: Recurrent disease after limited parathyroidectomy for sporadic primary hyperparathyroidism.

J Am Coll Surg 199: 849-855, (2004)

Cardinal, J.W., Bergman, N.H., Sweet, A., Warner, J., Marks, L., Learoyd, T., Dwight, T., Robinson, B., Epstein, M., Smith, M., Teh, B.T., Cameron, D.P. und Prins, J.B.: A report of a national mutation testing service for the MEN I gene: clinical presentations and implications for mutation testing.

J Med Genet 42: 69-74, (2005)

Carling, T., Correa, P., Hessman, O., Hedberg, J., Skogseid, B., Lindberg, D., Rastad, J., Westin, G., und Akerström, G.: Parathyroid MEN I gene mutations in relation to clinical characteristics of nonfamilial primary hyperparathyroidism.

J Clin Endocrinol Metab 83(8): 2960-2963, (1998)

Carty, S.E., Helm, A.K., Amico, J.A., Clarke, M.R., Foley, T.P., Watson, C.G. Mulvihill, J.J.: The variable penetrance and spectrum of manifestations of multiple endocrine neoplasia type I.

Surgery 124: 1106- 1114, (1998)

Chakrabarti, R., Srivatsan, E.S., Wood, T.F. Eubanks, P.J., Ebrahimi, S.A., Gatti, R.A., Passaro, E. und Sawicki, M.P.: Deletion mapping of endocrine tumors localizes a second tumor suppressor gene on chromosome band 11q13.

Genes Chromosomes Cancer 22: 130-137, (1998)

Chandrasekharappa, S.C., Guru, S.C., Manickam, P.: Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type I.

Science 276: 404-407, (1997)

Crabtree, J.S., Scacheri, P.C., Ward, J.M., Garrett-Beal, L., Emmert-Buck, M.R., Edgemon, K.A., Lorang, D., Libutti, S.K., Chandrasekharappa, S.C., Marx, S.J., Spiegel, A.M., Collins, F.S.: A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type I, develops multiple endocrine tumors.

Proc Natl Acad Sci USA 98(3): 1118-1123, (2001)

Creutzfeldt, W., Arnold, R., Creutzfeldt, C., Track, N.S.: Pathomorphologic, biochemical and diagnostic aspects of gastrinomas (Zollinger-Ellison-Syndrome)

Cupisti, K., Höppner, W., Dotzenrath, C., Simon, D., Berndt, I., Röher, H.D. und Goretzki, P.E.: Lack of MEN I gene mutations in 27 sporadic insulinomas.

Eur J Clin Invest 30: 325-329, (2000)

Cupisti, K.: 50 Jahre MEN I, 1954- 2004

Viszeralchirurgie 40: 62-65, (2005)

Dean, P.G., van Heerden, J.A., Farley, D.R., Thomson, G.B., Grand, C.S.: Are patients with multiple endocrine neoplasia type I prone to premature death?

World J Surg 24: 1437-1441, (2000)

Debelenko, L.V., Brambilla, E., Agarwal, S.K., Swalwell, J.I., Kester, M.B., Lubensky, I.A., Zhuang, Z., Guru, S.C., Manickam, P., Olufemi, S.E., Chandrasekharappa, S.C., Crabtree, J.S., Kim, Y.S., Heppner, C., Burns, A.L., Spiegel, A.M., Marx, S.J., Liotta, L.A., Collins, F.S., Travis, W.D., und Emmert-Buck, M.R.: Identification of MEN I gene mutations in sporadic carcinoid tumors of the lung.

Hum Mol Genet 6(13): 2285-2290, (1997)

Doherty, G.M., Olson, J.A., Frisella, M.M., Lairmore, T.C., Wells, S.A., Norton, J.A.: Lethality of multiple endocrine neoplasia type I.

World J Surg 6: 581-585, (1998)

Doherty, G.M., Lairmore, T.C. und DeBenedetti, M.K.: Multiple endocrine neoplasia type I parathyroid adenoma development over time.

World J Surg 28: 1139-1142, (2004)

Doherty, G.M.: Multiple endocrine neoplasia type I.

J Surg Oncol 89: 143-150, (2005)

Dralle, H.: The MEN1 syndrome: the actual role of genetic testing on the timing and extent of surgery.

Langenbecks Arch Surg 386: 545-546, (2002)

Dralle, H., Krohn, S.L., Karges, W.: Surgery of resectable nonfunctioning neuroendocrine pancreatic tumors.

World J Surg 28: 1248-1260 (2004)

Farnebo, F., Teh, B.T., Kytölä, S., Svensson, A., Phelan, C., Sandelin, K., Thompson, N.W., Höög, A., Weber, G., Farnebo, L.-O. und Larsson, C.: Alterations of the MEN I gene in sporadic parathyroid tumors.

J Clin Endocrinol Metab 83(8): 2627-2630, (1998)

Fraker, D.L., Norton, J.A., Alexander, H.R.: Surgery in Zollinger-Ellison syndrome alters the natural history of gastrinoma.

Ann Surg 220: 320-330 (1994)

Gagel, R.V. und Marx, S.J. In: Textbook of endocrinology: multiple endocrine neoplasia. Larsen, P.R., Kronenberg, H.M., Melmed, S., and Polonsky, K.(eds.). W.B. Saunders, Philadelphia. P.A. (2002)

Gibril, F., Reynolds, J.C., Doppman, J.L.: Somatostatin receptor scintigraphy: sensitivity compared with that of other imaging methods in detecting primary and metastatic gastrinomas.

Ann Int Med 125: 26-34 (1996)

Giraud, S., Zhang, C.X., Serova-Sinilnikova, O., Wautot, V., Salandre, J., Buisson, N., Waterlot, C., Bauters, C., Porchet, N., Aubert, J.-P., Emy, P., Cadiot, G., Delemer, B., Chabre, O., Niccoli, P., Leprat, F., Duron, F., Emperauger, B., Cougard, P. und Mitarbeiter: Germ-line mutation analysis in patients with multiple endocrine neoplasia type I and related disorders.

Am J Hum Genet 63: 455-467, (1998)

Goebel, S.U., Heppner, C., Burns, A.L., Marx, S.J., Spiegel, A.M., Zhuang, Z., Lubensky, I.A., Gibril, F., Jensen, R.T., Serrano, J.: Genotype / phenotype correlation of multiple endocrine neoplasia type I gene mutations in sporadic gastrinomas.

J Clin Endocrinol Metab 85(1): 116-123, (2000)

Gortz, B., Roth J., Speel, E.J., Krahenmann, A., De Krijger, R.R., Matias-Guiu, X., Muletta-Feurer, S., Rutmann, K., Saremaslani, P., Heitz, P.U., Komminoth, P.: MEN I gene mutation analysis of sporadic adrenocortical lesions.

Int J Cancer 80(3): 373-379, (1999)

- Goudet, P., Cougard, P., Verges, B., Murat, A., Carnaille, B., Calender, A., et al.  
Hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type I : surgical trends and results of a 256-patient series from Groupe d'Etude des Neoplasies Endocriniennes Multiples Study Group, *World J Surg* 25 : 886-890, (2001)
- Gumbs, A.A., Moore, P.S., Falconi, M. und Mitarbeiter: Review of the clinical, histological and molecular aspects of pancreatic endocrine neoplasms.  
*J Surg Oncol* 81: 45-53, (2002)
- Hai, N., Aoki, N., Matsuda, A., Mori, T., und Kosugi, S.: Germline MEN I mutations in sixteen Japanese families with multiple endocrine neoplasia type I (MEN I).  
*Eur J Endocrinol* 141: 475-480, (1999)
- Hellman, P., Skogseid, B., Oberg, K., Juhlin, C., Akerstrom, G. und Rastad, J.: Primary and reoperative parathyroid operations in hyperparathyroidism of multiple endocrine neoplasia type I.  
*Surgery* 124: 993-999, (1998)
- Heppner, C., Kester, M.B., Agarwal, S.K., Debelenko, L.V., Emmert-Buck, M.R., Guru, S.C., Manickam, P., Olufemi, S.E., Skarulis, M.C., Doppman, J.L., Alexander, R.H., Kim, Y.S., Saggat, S.K., Lubensky, I.A., Zhuang, Z., Liotta, L.A., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., Burns, A.L., Marx, S.J.: Somatic mutation of the MEN I gene in parathyroid tumors.  
*Nat Genet* 16(4): 375-378, (1997)
- Hessman, O., Lindberg, D., Skogseid, B., Carling, T., Hellman, P., Rastad, J., Akerström, G., und Westin, G.: Mutation of the multiple endocrine neoplasia type I gene in nonfamilial, malignant tumors of the endocrine pancreas.  
*Cancer Res* 58: 377-379, (1998)
- Hubbard, J.G., Sebag, F., Mawaja, S., Henry, J.F.: Primary hyperparathyroidism in MEN I – how radical should surgery be?  
*Langenbecks Arch Surg* 386(8): 553-557, (2002)

Imamura, M., Takahashi, K., Adachi, H., Minematsu, S., Shimasa, Y., Naito, M.: Usefulness of selective arterial secretin injection test for localisation of gastrinoma in the Zollinger-Ellison syndrome.

Ann Surg 205: 230 (1987)

Irwin, G.L., Carneiro, D.M. und Solorzano, C.: Progress in the operative management of sporadic primary hyperparathyroidism over 34 years.

Ann Surg 239(5): 704-711, (2004)

Jensen, R.T., Gardner, J.D.: Gastrinoma. In: Go, V.L.W., Di Magno, E.P., Gardner, J.D. (eds) The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease, 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press, New York, pp 931-978 (1993)

Jensen, R.T.: Pancreatic endocrine tumors: recent advances.

Ann Oncol 10: S170-S176, (1999)

Karges, W., Schaaf, L., Dralle, H. und Boehm, B.O.: Concepts for screening and diagnostic follow-up in multiple endocrine neoplasia type I (MEN I).

Exp Clin Endocrinol Diabetes 108: 334-340, (2000)

Karges, W., Schaaf, L., Dralle, H., Boehm, B.O.: Clinical and molecular diagnosis of multiple endocrine neoplasia type I.

Langenbecks Arch Surg 386(8): 547-552, (2002)

Kassem, M., Kruse, T.A., Wong, F.K., Larsson, C. und Teh, B.T.: Familial isolated hyperparathyroidism as a variant of multiple endocrine neoplasia type I in a large Danish pedigree.

J Clin Endocrinol Metab 85: 165-167, (2000)

Katai, M., Sakurai, Y., Hashizume, K.: Primary hyperparathyroidism in patients with multiple endocrine neoplasia type I: comparison with sporadic parathyroid adenomas.

Horm Metab Res 33: 499-503, (2001)



Klöppel, G., IntVeld, P.A., Komminoth, P. und Mitarbeiter: The endocrine pancreas. In: Kovacs, K., Asa, S.L., eds. Functional Endocrine Pathology, 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Blackwell Scientific Publications, 415-487, (1998)

Knudson, A.G.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Prac Natl Acad Sci USA* 68: 820-823, (1971)

Knudson, A.G.: Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 157-162, (2001)

Komminoth, P., Heitz, P.U., Klöppel, G.: Pathology of MEN-I: morphologic, clinicopathologic correlations and tumor development. *J Int Med* 243: 455-464, (1998)

Kopp, I., Bartsch, D.K., Wild, A., Schilling, T., Nies, C., Bergenfelz, A., Rieder, H., Simon, B. und Rothmund, M.: Predictive genetic screening and clinical findings in multiple endocrine neoplasia type I families. *World J Surg* 25(5): 610-616, (2001)

Kouvaraki, M.A., Solorzano, C.C., Shapiro, S.E.: Surgical treatment of non-functioning pancreatic islet cell tumors. *J Surg Oncol* 89: 170-185 (2005)

Lairmore, T., Chen, V., DeBenedetti, M.: Duodenopancreatic relations in the patients with multiple endocrine neoplasia type I. *Ann Surgery* 231: 909-919 (2000)

Langer, P., Wild, A., Nies, C., Rothmund, M., Bartsch, D.K.: Variable expression of multiple endocrine neoplasia type I – implications for screening strategies. *Int J Surg Invest* 3: 473-481, (2001)

Langer, P., Cupisti, K., Bartsch, D.K., Nies, C., Goretzki, P.E., Rothmund, M. und Roher, H.D.: Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type I.

World J Surg 26(8): 891-896, (2002)

Langer, P., Kann, P.H., Fendrich, V.: Prospective evaluation of imaging procedures for the detection of pancreaticoduodenal endocrine tumors in patients with multiple endocrine neoplasia type I.

World J Surg 28: 1317-1322 (2004)

Langer, P., Bartsch, D.K., Rothmund, M.: MEN I-Syndrom; Klinik, Diagnostik und Screening in Harder, Siewert: „Praxis der Visceralchirurgie- Endokrine Chirurgie“, 2. Auflage, Springer-Verlag 2007

Langer, P., Bartsch, D.K., Rothmund, M.: MEN I-Syndrom; Operative Therapie und Nachsorge in Rothmund, Harder und Siewert: „Praxis der Visceralchirurgie- Endokrine Chirurgie“, 2. Auflage, Springer-Verlag 2007

Langer, P., Sungler, P.: Endokrine Pankreastumore in Gnant und Schlag eds.: Tumorthherapie; Springer-Verlag, im Druck

Larsson, C., Skogseid, B., Oberg, K., Nakamura, Y., Nordenskjold, M.: Multiple endocrine neoplasia type I gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. Nature 332: 85-87, (1988)

Lo, C.Y., van Heerden, J.A., Thompson, G.B.: Islet cell cacinomas of the pancreas. World J Surg 20: 878-884 (1996)

Marx, S., Spiegel, A.M., Skarulis, M.C., Doppman, J.L., Collins, F.S., und Liotta, L.A.: Multiple endocrine neoplasia type I: clinical and genetic topics. Ann Intern Med 129: 484-494, (1998)

Marx, S.J., Agarwal, S.K., Kester, M.B., Heppner, C., Kim, Y.S., Skarulis, M.C., James, L.A., Goldsmith, P.K., Sagggar, S.K., Park, S.Y., Spiegel, A.M., Burns, A.L., Debelenko, L.V., Zhuang, Z., Lubensky, I.A., Liotta, L.A., Emmert-Buck, M.R., Guru, S.C., Manickam, P., Crabtree, J., Erdos, M.R., Collins, F.S., Chandrasekharappa, S.C.: Multiple endocrine neoplasia type I: clinical and genetic features of the hereditary endocrine neoplasias.

Recent Prog Horm Res 54: 397-438, (1999) Review

Marx, S.J.: Multiple endocrine neoplasia type 1. In: Scriver C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8<sup>th</sup> Ed. New York, McGraw-Hill; 943-966, (2001)

Metz, D.C., Jensen, R.T., Bale, A.E., Skarulis, M.C., Eastman, R.C., Nieman, L., Norton, J.A. et al.: Multiple endocrine neoplasia type I: clinical features and management. In: Bilezikian, J.P., Levine, M.A., Marcus, R., Friedman, E., Larsson, C., Amorosi, A., Bernadi, M.L., Marx, S.J. The parathyroids. New York: Raven Press, 591-645, (1994)

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 16(3): 1215, (1988)

Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155: 335-350, (1987)

Mutch, M.G., Dilley, W.G., Sanjurjo F., DeBenedetti, M.K., Doherty, G.M., Wells, S.A., Goodfellow, P.J., Lairmore, T.C.: Germline mutations in the multiple endocrine neoplasia type I gene: Evidence for frequent splicing defects.

Hum Mutat 13: 175-185, (1999)

Newton C.R. und Graham A.: PCR. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage (1994)

Nilsson, I.L., Yin, L., Lundgren, E., Rastad, J., Ekbom, A.: Clinical presentation of primary hyperparathyroidism in Europe - nationwide cohort analysis on mortality from nonmalignant causes.

J Bone Miner Res 17: 68-74, (2002)

Noone, T.C., Hosey, J., Firat, Z., Semelka, R.C.: Imaging and localization of islet-cell tumors of the pancreas on CT and MRI.

Best Practice Res Clin Endocrinol Metab 2: 195-211 (2005)

Norton, J., Alexander, R., Fraker, D., Venzon, D., Gibril, F., Jensen, R.: Comparison of surgical results in the patients with advanced and limited disease with multiple endocrine neoplasia type I and Zollinger-Ellison syndrome.

Ann Surgery 234: 495-506 (2001)

Olufemi, S.E., Green, I.S., Manickam, P., Guru, S.C., Agarwal, S.K., Kester, M.B., Dong, Q., Burns, A.L., Spiegel, A.M., Marx, S.J., Collins, F.S., Chandrasekharappa, S.C.: Common ancestral mutation in the MEN1 gene is likely responsible for the prolactinoma variant of MEN I (MEN I Burin) in four kindreds from Newfoundland.

Hum Mutat 11: 264-269, (1998)

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. und Sekiya T. Proc Natl Acad Sci USA 86: 2766 (1989)

Poisson, A., Zablewska, B. und Gaudray, P.: Menin interacting proteins as clues toward the understanding of multiple endocrine neoplasia type I.

Cancer Letters 189: 1-10, (2003) Mini-review

Poncin, J., Stevenaert, A., Beckers, A.: Somatic MEN I gene mutation does not contribute significantly to sporadic pituitary tumorigenesis.

Eur J Endocrinol 140(6), (1999)

Prezant, T.R., Levine, J., Melmed, S.: Molecular characterization of the men I tumor suppressor gene in sporadic pituitary tumors.

J Clin Endocrinol Metab 83(4): 1388-1391, (1998)

Quatrini, M., Castoldi, L., Rossi, G., Cesana, B., Peracchi, M. und Bardella, M.T.: A follow-up study of patients with Zollinger-Ellison syndrome in the period 1966-2002: Effects of surgical and medical treatments on long-term survival.

J Clin Gastroenterol 39(5): 376-380, (2005)

Rizzoli, R., Green, J., Marx, S.J.: Primary hyperparathyroidism in familial multiple endocrine neoplasia type I: Long-term follow-up of serum calcium levels after parathyroidectomy.

Am J Med 78: 467-474, (1985)

Rothmund, M., Angelini, L., Brunt, M.: Surgery for benign insulinoma: an international review.

World J Surg 14: 393-398 (1990)

Sanger F., Coulson A.R.: The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. FEBS Lett 87(1): 107-110, (1978)

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74(12): 5463-5467, (1977)

Sato, M., Matsubara, S., Miyauchi, A., Ohye, H., Imachi, H., Murao, K. und Takahara, J.: Identification of five novel germline mutations of the MEN I gene in Japanese multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) families.

J Med Genet 35: 915-919, (1998)

Scherübl, H., Schaaf, L., Raue, F., Faiss, S., Zeitz, M.: Hereditäre neuroendokrine gastroenteropankreatische Tumoren und multiple endokrine Neoplasie Typ I. II. Aktuelle Therapie.

Dtsch Med Wochenschr 129: 689-692, (2004)

Schussheim, D.H., Skarulis, M.C., Agarwal, S.K., Simonds, W.F., Burns, A.L., Spiegel, A.M. und Marx, S.J.: Multiple endocrine neoplasia type I: new clinical and basic findings.

Trends Endocrinol Metab 12(4): 173-178, (2001) Review

Shan, L., Nakamura, Y., Nakamura, M., Yokoi, T., Tsujimoto, M., Arima, R., Kameya, T. und Kakudo, K.: Somatic mutations of multiple endocrine neoplasia type I gene in the sporadic endocrine tumors.

Lab Invest 78(4): 471-475, (1998)

Sheffield V.C., Beck J.S., Kwitek A.E., Sandstrom D.W., Stone E.W.: The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. Genomics 16 (2): 325-332, (1993)

Sheperd J.J.: The natural history of multiple endocrine neoplasia type I: highly uncommon or highly unrecognized?

Arch Surg 126: 935-952, (1991)

Silverberg, S.J., Shane, E., Jacobs, T.P., Siris, E. und Bilezikian, J.P.: A 10-year prospective study of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery.

N Engl J Med 341: 1249-1255, (1999)

Skogseid, B. und Öberg, K.: Experience with multiple endocrine neoplasia type I screening.

J Int Med 238: 255-259, (1996)

Skogseid, B., Öberg, K., Eriksson, B., Juhlin, C., Granberg, D., Akerstrom G. Rastad, J.: Surgery for asymptomatic pancreatic lesion in multiple endocrine neoplasia type I.

World J Surg 20: 872-876, (1996)

Skogseid, B., Rastad, J., Akerström, G.: Pancreatic endocrine tumors of multiple endocrine neoplasia type 1: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, In: Doherty, G., Skogseids, B., (eds) Surgical endocrinology pp. 511-525 (2001)

Solorzano, C.C., Lee, J.E., Pisters, P.T.W.: Nonfunctioning islet cell carcinoma of the pancreas: Survival results in a contemporary series of 163 patients.

Surgery 130: 1078-1085 (2001)

Stewler, G.J., Rosenblatt, M.: Mineral metabolism. In: Felig, P., Baxter, U.D., Frohman, L.A.(eds.). Endocrinology and metabolism, 3<sup>rd</sup> ed, New York, McGraw-Hill; 1407-1516, (1995)

Tanaka, C., Kimura, T., Yang, P., Moritani, M., Yamaoka, T., Yamada, S., Sano, T., Yoshimoto, K., Itakura, M.: Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 11 and infrequent inactivation of the MEN I gene in sporadic pituitary adenomas.

J Clin Endocrinol Metab 83(8): 2631-2634, (1998)

Teh, B.T., Kytola, S., Farnebo, F., Bergman, L., Wong, F.K., Weber, G., Hayward, N., Larsson, C., Skogseid, B., Beckers, A., Phelan, C., Edwards, M., Epstein, M., Alford, F., Hurley, D., Grimmond, S., Silins, G., Walters, M., Stewart, C., Cardinal, J., Khodaei, S., Parente, F., Tranebjaerg, L., Jorde, R., Salmela, P. und Mitarbeiter: Mutation analysis of the MEN I gene in multiple endocrine neoplasia type I, familial acromegaly and familial isolated hyperparathyroidism.

J Clin Endocrinol Metab 83: 2621-2626, (1998)

Thakker, R.V.: Multiple endocrine neoplasia-syndromes of the twentieth century (editorial).

J Clin Endocrinol Metab 83: 2617-2620, (1998)

Thakker, R.V.: Multiple endocrine neoplasia type I.

Endocrinol Metab Clin North Am 29: 541-567, (2000)

Timm, S.: Nuklearmedizinische Diagnostik des primären Hyperparathyreoidismus.

Der Nuklearmediziner 26: 13-20, (2003)

Thompson, N.W., Bondeson, A.G., Bondeson, L., Vinik, A.: The surgical treatment of gastrinoma in MEN I syndrome patients.

Surgery 106: 1081 (1989)

Trump, D., Farren, B., Wooding, C., Pang, J.T., Besser, G.M., Buchanan, K.D., Edwards, C.R., Heath, D.A., Jackson, C.E., Jansen, S., Lips, K., Monson, J.P., O'Halloran, D., Sampson, J., Shalet, S.M., Wheeler, M.H., Zink, A., Thakker, R.V.: Clinical studies of multiple endocrine neoplasia type I (MEN I).

QJM 89: 653-659, (1996)

Tsukada, T., Kishi, M., Obara, T., und Yamaguchi, K.: An intronic splicing mutation of the MEN I gene.

Int J Cancer 87: 305-307, (2000)

Uchino, S., Noguchi, S., Sato, M., Yamashita, H., Yamashita, H., Watanabe, S., Murakami, T., Toda, M., Ohshima, A., Futata, T., Mizukoshi, T., Koike, E., Takatsu, K., Terao, K., Wakiya, S., Nagatomo, M., und Adachi, M.: Screening of the MEN I gene and discovery of germ-line and somatic mutations in apparently sporadic parathyroid tumors.

Cancer Res 60: 5553-5557, (2000)

Vasen, H.F.A., Lamers, C.B., Lips, C.J.M.: Screening for the multiple endocrine neoplasia syndrome type I: a study of 11 kindreds in the Netherlands.

Arch Intern Med 149: 2717-2722, (1989)

Virgolini, I., Traub-Weidinger, T., Decristoforo, C.: Nuclear medicine in the detection and management of pancreatic islet-cell tumors.

Best Practice Res Clin Endocrinol Metab 2: 213-227 (2005)

Wang, E.H., Ebrahimi, S.A., Wu, A.Y., Kashefi, C., Passaro, E., Sawicki, M.P.: Mutation of the MENIN gene in sporadic pancreatic endocrine tumors.

Cancer Res 58(19): 4417-4420, (1998)



Weiss, M.: Kann durch den zusätzlichen Einsatz der SPECT-Technik die diagnostische Aussage der präoperativen Tc-99m-MIBI-Szintigraphie beim primären Hyperparathyreoidismus verbessert werden.

Medizinische Klinik 97(7): 389-395, (2002)

Wermer, P.: Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands.

Am J Med 16: 363-371, (1954)

Zhuang, Z., Vortmeyer, A.O., Pack, S., Huang, S., Pham, T.A., Wang, C., Park, W.S., Agarwal, S.K., Debelenko, L.V., Kester, M., Guru, S.C., Manickam, P., Olufemi, S.E., Heppner, C., Crabtree, J.S., Skarulis, M.C., Venzon, D.J., Emmert-Buck, M.R., Spiegel, A.M., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Burns, A.L., Marx, S.J., Lubensky, I.A. und Mitarbeiter: Somatic mutations of the MEN I tumor suppressor gene in sporadic gastrinomas and insulinomas.

Cancer Res 57: 4682-4686, (1997a)

Zhuang, Z., Ezzat, S.Z., Vortmeyer, A.O., Weil, R., Oldfield, E.H., Park, W.S., Pack, S., Huang, S., Agarwal, S.K., Guru, S.C., Manickam, P., Debelenko, L.V., Kester, M.B., Olufemi, S.E., Heppner, C., Crabtree, J.S., Burns, A.L., Spiegel, A.M., Marx, S.J., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Emmert-Buck, M.R., Liotta, L.A., Asa, S.L., Lubensky, I.A.: Mutations of the MEN I tumor suppressor gene in pituitary tumors.

Cancer Res 57(24): 5446-5451, (1997b)

Zollinger, R.M., Ellison, E.H.: Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas.

Ann Surgery 142: 709-726 (1955)

## 7. ANHANG

### 7.1. Chemikalien und Geräte

#### 7.1.1. Oligonukleotide

<i>Synthetische Oligonukleotidprimer</i>	Perkin Elmer	Weiterstadt, Deutschland
--	--------------	--------------------------

#### 7.1.2. Enzyme

<i>AmpliTaQr FS BigDyeTerminator</i>	ABI Prism, Applied Biosystems	USA
<i>Proteinkinase K</i>	Boehringer	Ingelheim, Deutschland
<i>Taq DNA-Polymerase</i>	Promega	Madison, USA

#### 7.1.3. Chemikalien

<i>QIAmp Tissue Kit (Kat.Nr.29306)</i>	Qiagen	Hilden, Deutschland
<i>QIAquick Gel Extraction Kit (Kat.Nr.28706)</i>	Qiagen	Hilden, Deutschland
<i>Rotiphorese 30%</i>	Roth	Karlsruhe, Deutschland
<i>SDS (10%)</i>	Serva	Heidelberg, Deutschland
<i>TEMED</i>	Roth	Karlsruhe, Deutschland
<i>Tris</i>	Roth	Karlsruhe, Deutschland
<i>Template Suppression Reagent (TSR)</i>	ABI Prism, Applied Biosystem	USA
<i>Xylencyanol</i>	Merck	Darmstadt, Deutschland
<i>50 bps Größenmarker</i>	Gene Ruler 50 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, Großbritannien

#### 7.1.4. Radioaktive Chemikalien

<i>P<sup>33</sup>- Phosphor</i>		
---------------------------------	--	--

#### 7.1.5. Puffer und Lösungen

<i>Red cell lysis buffer ( RCLB )</i> <i>pH-Wert 7,6</i>	10 mM Tris Base 5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM NaCl
<i>SE-Puffer</i> <i>pH-Wert 8</i>	75 mM NaCl 25 mM EDTA
<i>Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) 10x</i>	Tris-Puffer 108g/l Borsäure 55g Na <sup>2</sup> -EDTA 8,2g/l
<i>TE-Puffer</i>	10 mM Tris / HCl 1 mM EDTA
<i>Stopplösung</i>	40 ml Formamid 40 mg Bromphenolblau 40 mg Xylenecyanol 800 µl EDTA

#### 7.1.6. Geräte

<i>ABI PRISM 310</i> <i>Genetic Analyzer</i>	Perkin Elmer	USA
<i>Agarosegelkammer</i>	Sub-Cell GT	BioRad, München / USA
<i>Autoklav</i>	System	Wettenberg, Deutschland
<i>DNA- Photometer</i>	Pharmacia Biotech Ultrospec 3000	Cambridge, Großbritannien
<i>Eismaschine</i>	Ziegler	Isernhagen, Deutschland
<i>Feinwaage</i>	Sartorius 1003	Göttingen, Deutschland
<i>Filter für HPLC</i>	Millipore	Molsheim, Frankreich
<i>Gelkämme</i>	Power Pac 300	USA
<i>Geltrockner</i>	Savant-Slab Gel Dryer	Farmingdale, USA

<i>Handschuhe</i>	Safe Ex, Ansell Nitrile	Zimmerwald, Schweiz
<i>Heizblock</i>	Haep Labor Consult	Bovenden, Holland

## 7.2. Einwilligungserklärung für molekulargenetische Untersuchungen

### Einwilligungserklärung



MEDIZINISCHES ZENTRUM FÜR OPERATIVE MEDIZIN I  
Klinik für Allgemeinchirurgie, Philipps-Universität Marburg  
Leiter. Prof. Dr. med. M. Rothmund  
Forschungsgruppe Pankreas  
Baldinger Str.  
35033 Marburg

Projektleiter: PD Dr. med. D. Bartsch

Tel.: 06421/28-62582

Fax.: 06421/28-63851

### EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG

#### Forschungsprojekt:

*Molekulargenetische Untersuchungen zur Entstehung und Progression von  
endokrinen Tumoren im Rahmen des MEN-1-Syndroms*

Inhalt, Vorgehensweise, Risiken und Ziel des obengenannten Forschungsprojektes hat mir Dr. .... ausreichend erklärt. Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen und habe hierauf Antwort erhalten. Es wurde mir ein Exemplar der Patienteninformation ausgehändigt. Ich hatte ausreichend Zeit, mich für oder gegen die Teilnahme am Projekt zu entscheiden. Meine Zustimmung ist freiwillig und kann jederzeit, ohne Angabe von Gründen und ohne daraus resultierende Nachteile widerrufen werden. Ich willige hiermit in die Teilnahme am Forschungsprojekt ein und ich bin damit einverstanden, gegebenenfalls direkt wegen weiterer Informationen oder Terminabsprachen angeschrieben zu werden. Ich gestatte, daß meine Blut- und Gewebeproben nach Abschluß des Projektes weiterhin unentgeltlich für wissenschaftliche Zwecke verwendet werden.

.....  
(Name des Patienten)

.....  
Ort, Datum

.....  
(Unterschrift des Patienten)

### **7.3. Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Bien, Boudriot, Christ, Daut, Eilers, Fruhstorfer, Gemsa, Gerdes, Geus, Gotzen, Griss, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Heeg, Hellinger, Hesse, Hinrichs, Höffken, Hofbauer, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmar, Krieg, Kroll, Lammel, Lang, Lennartz, Leppek, Lill, Löffler, Lorenz, Maisch, Mann, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Renz, Riera, Röhm, Rothmund, Schmidt, Seitz, Seyberth, Steiniger, Stiletto, Vogelmeier, Vohlhand, Voigt, Walter, Weihe, Werner, Westermann, Wilke.

#### **7.4. Danksagung**

Herrn Prof. D. K. Bartsch für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit.

Herrn PD Dr. P. Langer für die Übernahme der Betreuung, für die Hilfestellung und die konstruktive Kritik bei der schriftlichen Ausarbeitung.

Meinen Eltern für die Ermöglichung und Unterstützung während des Studiums, meinem Vater für das Korrekturlesen der Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt der Medizin–Technischen Assistentin Frau Brunhilde Chaloupka, die mir nicht nur fachlich, sondern auch menschlich bei der Durchführung der experimentellen Arbeit im Labor zur Seite stand.